



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA



Fábio José Bianchi
CIRURGIÃO-DENTISTA

**“INFLUÊNCIA DO SEXO, DO CICLO ESTRAL E DO
ESTRESSE AGUDO NAS RESPOSTAS HORMONAIIS E
METABÓLICAS EM RATOS”.**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre em
Odontologia, Área de concentração em
Fisiologia Oral.*

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

PIRACICABA

2004

Fábio José Bianchi
CIRURGIÃO-DENTISTA

**“INFLUÊNCIA DO SEXO, DO CICLO ESTRAL E DO
ESTRESSE AGUDO NAS RESPOSTAS HORMONAIS E
METABÓLICAS EM RATOS”.**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre em
Odontologia, Área de concentração em
Fisiologia Oral.*

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luíz Carlos Marques Vanderlei

Profa. Dra. Maria José C. S. Moura

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Piracicaba - SP

2004

Ficha Catalográfica

B47i Bianchi, Fábio José.
Influência do sexo, do ciclo estral e do estresse agudo nas respostas hormonais e metabólicas em ratos. / Fábio José Bianchi. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
xiii, 73f. : il.

Orientadora : Prof^a Dr^a Fernanda Klein Marcondes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Natação. 2. Glicogênio. 3. Glicose. 4. Corticosterona. 5. Progesterona. 6. Estradiol. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

**Folha de aprovação
fornecida pela CGPG**

DEDICATÓRIA

A Deus, luz de todos os túneis, razão de nossa existência e força. Deus que se revela em cada passo que damos, em cada desafio que vencemos e em cada sorriso ou lágrima.

À minha avó materna Odette Viaro Armbruster [in memoriam], embora não esteja mais presente neste mundo, foi imprescindível para obter este sucesso. Gostaria de agradecer por minha educação, por todo o amor, solidariedade, paz, felicidade que fizeram parte da minha infância e adolescência.

À minha mãe Marigleides Aparecida Armbruster Bianchi, obra poética, que palavras não são suficientes para descrever seu amor, apoio e compreensão e que muito me auxiliou a realizar esta conquista, mesmo que vencendo muitas adversidades. Fica a homenagem pelo exemplo de força, coragem, amor e carinho. Com todo o amor de mãe ensinou-me a enfrentar o mundo de uma forma tão digna e me mostrou que um caminho embora não passe de um caminho sempre deve ser trilhado e a decisão de continuar nele ou abandoná-lo deve ser livre de medo e ambição.....

Vejo em teus olhos, mãe, toda a doçura
Que espelha tua vida terna e calma,
No teu sorriso há a simples candura
Que existe no mais fundo de tua alma.

Tu és um anjo bom em nosso lar,
Nosso refúgio e toda a esperança
E quando tu nos vem aconselhar,
Surge sobre nós a paz e a bonança.

**São felizes os dias a teu lado,
Tu és um presente idolatrado,
Representas, enfim, fé e guarida.**

**E digo-te, feliz com teu carinho:
- Se sou de tua vida um pedacinho,
Tu és, por certo, toda a minha vida.**

Adaptado de Maria Amélia Porto Alegre Amaral, 1968.

À minha irmã Fabiane e cunhado Vanderlei pelo empenho e precioso consolo nos momentos de aflição, pelo carinho sempre farto e por ajudarem a mudar minhas atitudes.

À minha irmã Christiane e cunhado Antonio Carlos, por sempre se preocuparem comigo e apoio nos momentos difíceis.

À minha sobrinha e amiga Bianca, luz dos meus dias, sorriso dos meus lábios, minha grande companheira..... como tenho que lhe agradecer.....pelo amor, carinho e por acreditar sempre em mim e tentar sempre melhorar o meu astral.

Oração de São Francisco de Assis

Ó, Senhor!

*Faz de mim um instrumento da Tua Paz;
Onde há ódio, faz que eu leve o Amor;
Onde há ofensa, que eu leve o Perdão;
Onde há discórdia, que eu leve a União;
Onde há dúvidas, que eu leve a Fé;
Onde há erros, faz que eu leve a Verdade;
Onde há desespero, que eu leve a Esperança;
Onde há tristeza, que eu leve a Alegria;
Onde há trevas, que eu leve a Luz;
Ó Mestre! Faz que eu procure menos
Ser consolado, do que consolar;
Ser compreendido, do que compreender;
Ser amado, do que amar.....
Porquanto;
É dando que se recebe;
É perdoando que se é perdoado;
É morrendo que se vive para a vida eterna.*

Todos são inteligentes! Mas aqueles que sabem desenvolver com maior empenho a sua inteligência e as suas faculdades espirituais são também mais modestos e mais humildes que os outros. Porque a verdadeira inteligência é humilde e a humildade é a compreensão sincera e respeito aos outros. Quem quer emergir sobre os outros desprezando ou invejando a grandeza não desenvolve a inteligência, mas consome todas as suas energias lutando inutilmente.

Gabriele Adani

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por toda a força e coragem de não desistir, mesmo quando os obstáculos pareciam ser intransponíveis ou quando os espinhos feriam a alma.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, na pessoa de seu DD. Diretor Professor Doutor Thales Rocha de Mattos Filho, pelas condições oferecidas para a realização deste Programa de Pós-Graduação.

À Capes pela bolsa concedida durante a realização deste Mestrado.

À coordenadora deste Programa de Pós-Graduação Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, agradeço o apoio, ética, exemplo de orientadora, encorajamento e força.

Às famílias Bianchi e Santarato, em especial ao Seu Pedro e ao querido Pedro Henrique, agradeço os momentos de diversão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Cecília F. Veiga, agradeço também os ensinamentos e constante estímulo em cada passo do meu caminho. Obrigado pela torcida, que jamais poderei pagar ato de tamanha bondade.

À Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes pela brilhante orientação.

À Profa. Claudia Herrera Tambeli, mesmo distante nos deixou ensinamentos imprescindíveis para a nossa formação.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial aos Professores deste Programa de Pós-Graduação.

Ao senhor Carlos Alberto Feliciano pelo apoio e auxílio no manejo e manutenção dos animais.

Às secretárias da Pós-Graduação e do Departamento Érica Alessandra, Sônia, Raquel, Eliete Riquetto e Elisa pela disponibilidade e atendimento imediato.

Aos meus colegas da LXII turma da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, agradeço a amizade, convivência e apoio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, agradeço a todos indistintamente.

Às estagiárias Kelly Roberta, Danielle Antônio e Érica pelo companheirismo e boas risadas.

A todos os colegas que fiz na Academia Podium de Limeira no ano de 2003/4, em especial a turma do “*spinning*”. Agradeço a amizade, as conversas descontraídas, o constante estímulo para nunca desistir (sejam nas “difíceis subidas” da aula ou nas etapas da vida). Em especial gostaria de agradecer a Dra. Ana Silvia Castro Gazotti, por ensinar o valor da minha profissão e livrar-me de “pensamentos escravos”, que nos tornam susceptíveis a maldade alheia. E também a instrutora Edilaine pelo incentivo constante.

A todos os meus **verdadeiros amigos**. Agradeço a força, presença constante em momentos de minha vida que pareciam que não iria suportar tantas adversidades. Tenho a sorte de terminar este mestrado, assim como terminei a graduação com amigos que estarão sempre ao meu lado. Aprendi o verdadeiro valor e importância da amizade com vocês. Sinto-os presente em cada passo que dou e mesmo que hoje algumas lágrimas se vertam, elas não serão suficientes para apagar a certeza de estarmos juntos a dividir toda esta emoção e outras glórias a serem conquistadas. Com certeza foram muitos risos, lágrimas misturados com realidade e enquanto houver esperança vocês continuarão fazendo parte da minha vida, passe o tempo que for. Agradeço em especial: Andressa, Carolina Patrícia Aires, Cecília Cláudia, Daniela Boleta-Ceranto, Elizabeth Ting, Fábio Jóia, Giovana Daniela, Guilherme, Juliana, Lívia, Maria Cláudia, Mariana Trevisani Arthuri, Regiane Yatsuda, Profa. Dra. Silvana Francisco, Vanessa de Moraes Rocha.

Um amigo é assim

É fácil afastar-se

Assim como você também ele tem os seus problemas

Mas quando necessitar ele estará aqui

Um amigo é assim

Não perguntará nem como, nem o porquê...

Te escutará e lutará por você

E depois tranquilo lhe sorrirá

Um amigo é assim

E recorda-se que até quando você viver
Se um amigo estiver com você, não se perderá
Em estradas erradas, percursos de quem
não tem na vida um amigo assim

Não há jamais necessidade de palavras
Só com um olhar entenderá
Que depois de um não ele lhe dirá sim
Um amigo é assim

E se lembre que até quando você desejar
Para sempre ao seu lado o encontrará
Perto de você, nunca cansado porque:
Um amigo é a coisa mais bela que há

Mas se lembre que até quando você viver
Se um amigo estiver com você, jamais o trairá
Só assim descobrirá que
Um amigo é a coisa mais bela que há

E lembre-se que até quando você viver
Um amigo é a coisa mais verdadeira que há
É a companhia da maior viagem que faz
Um amigo é qualquer coisa que não morre jamais

Tradução de Un amico é cosi
Cheope, Laura Pausini 1995.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO	9
PROPOSIÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	12
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

α - alfa

β - beta

μ L - microlitro

® - Marca registrada

°C – grau centígrado

¹²⁵I – Iodo 125

Acetil Coa – Acetil Coenzima A

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Tri-fosfato de adenosina

CEEA – Comitê de Ética na Experimentação Animal

CO₂ – Dióxido de carbono

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

CEMIB – Centro Multidisciplinar de Investigação Científica

EDTA - Ácido Etilenodiaminatetracético

et al. – Entre outros

FSH- Hormônio folículo-estimulante

HHA- Hipotálamo-hipófise-adrenal

KOH – Hidróxido de potássio

LH – Hormônio luteinizante

Ltda- Limitada

mL – mililitro

n° - número

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio

S.A – Sociedade anônima

SNC – Sistema Nervoso Central

SPF- specific pathogen free

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Metabolismo da glicose no fígado e sua distribuição para o organismo.

Figura 2. As vias de proteínas e aminoácidos no metabolismo.

Figura 3. As vias dos lipídios no metabolismo.

Figura 4. Coleta do lavado vaginal com 10 μ L de salina (Marcondes *et al.*, 2002).

Figura 5. Observação de lâmina a fresco no microscópio óptico, permitindo identificar e quantificar os tipos celulares (Marcondes *et al.*, 2002).

Figura 6. Procedimentos realizados para a ovariectomia: **A-** Incisão na pele após a tricotomia e anti-sepsia. **B-** Exposição do ovário. **C-** Amarelinha do ovário a ser extirpado para evitar hemorragia. **D-** Sutura. **E-** Ovário removido.

Figura 7. Figura do útero de animais normais e submetidos a ovariectomia **A-** Útero normal; **B-** Útero atrofiado 21 dias após a ovariectomia.

Figura 8. Ilustração da sessão de estresse por natação (Bianchi *et al.*, 2002).

Figura 9. Concentração tecidual de glicogênio no fígado de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais de cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos grupos controle de fêmeas em proestro, estro e metaestro. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 10. Concentração plasmática de glicose de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença

estatística em relação aos demais grupos controle * Diferença estatística em relação aos respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 11. Concentração plasmática de triglicerídeos de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 12. Concentração plasmática de corticosterona de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos grupos de fêmeas em estro e em diestro controle. # Diferença estatística em relação aos demais grupos submetidos ao estresse. * Diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 13. Concentração plasmática de estradiol de ratas controle e submetidas à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. * Diferença estatística em relação aos demais grupos controle e submetidos ao estresse ($p < 0,05$).

Figura 14. Concentração plasmática de progesterona de ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. # Diferença estatística em relação aos demais grupos submetidos ao estresse. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle. ($p < 0,05$).

Figura 15. Concentração tecidual de glicogênio no músculo cardíaco de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais de cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 16. Concentração tecidual de glicogênio no músculo sóleo de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais de cada grupo está indicado acima das barras.

◆ Diferença estatística em relação ao grupo controle de ratas em proestro, metaestro e diestro. # Diferença estatística em relação ao grupo controle de fêmeas em estro. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 17. Concentração tecidual de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras.

◆ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Figura 18. Concentração tecidual de glicogênio no músculo gastrocnêmio branco de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras.

◆ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do sexo e do ciclo estral nas respostas metabólicas e hormonais em ratos submetidos a estresse agudo. Ratos com 3 meses de idade, machos e fêmeas ovariectomizadas, ou com ciclo estral regular, foram usados (n = 7-11/grupo). Após a identificação da fase do ciclo estral, manipulação (machos) ou 21 dias após a castração, os animais foram submetidos a uma sessão de natação. Imediatamente após a aplicação do estresse, os animais foram sacrificados sob anestesia para coleta do sangue e dos tecidos. Estes procedimentos também foram realizados em animais controle. Amostras do fígado, coração, músculos sóleo, gastrocnêmio vermelho e branco foram usados para determinação da concentração tecidual de glicogênio (método colorimétrico do fenol-sulfúrico). Após a coleta de sangue e centrifugação, o plasma foi usado para determinação da concentração plasmática de glicose, triglicerídeos, corticosterona, estradiol e progesterona. A glicose e o triglicerídeo plasmáticos foram determinados por ensaios enzimáticos-colorimétricos. As determinações hormonais foram feitas por radioimunoensaio. Os dados foram analisados por ANOVA bifatorial seguida do teste de Tukey com nível de significância 5%. Ratos machos e fêmeas em diestro controle apresentaram maior concentração de glicogênio hepático quando comparados às demais fases do ciclo estral. A natação induziu uma diminuição neste parâmetro em todos os grupos analisados. Com relação ao glicogênio no músculo cardíaco, ratas em metaestro controle apresentaram menor concentração comparadas aos demais grupos e o estresse por natação causou mobilização em todos os grupos, exceto nesta fase do ciclo estral. Ratos machos e ratas em proestro controle apresentaram respectivamente concentração estatisticamente maior e menor de glicogênio no músculo sóleo comparados aos demais grupos e o estresse por natação induziu uma diminuição deste carboidrato em machos e fêmeas em estro, sem ocorrer alteração nas demais fases. Com relação ao glicogênio nos músculos gastrocnêmico vermelho e branco, machos apresentaram maior concentração basal deste polissacarídeo comparado aos demais grupos controle. Neste tecido o estresse por natação induziu diminuição nas concentrações de glicogênio em todos os grupos analisados. O grupo de ratas em metaestro controle apresentou maior glicemia em relação aos demais grupos. Após o estresse, ratos machos e fêmeas em proestro e em diestro

apresentaram elevação neste parâmetro, sem alteração em fêmeas em estro e em metaestro. Com relação às concentrações plasmáticas de triglicédeos, ratas em diestro controle apresentaram valores mais elevados que os demais grupos. Machos, fêmeas em proestro, estro e em metaestro submetidos à natação apresentaram elevação neste parâmetro, enquanto que o grupo de ratas em diestro apresentou diminuição. Ratas em metaestro apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona em relação aos demais grupos controle. Após o estresse, houve elevação neste parâmetro em todos os animais, validando o modelo de estresse utilizado, porém este aumento foi menor em machos. As concentrações basais de estradiol foram mais elevadas em ratas em proestro em relação aos outros grupos analisados. Após a sessão de natação somente nesta fase foi observado aumento, sem alterações nas demais fases do ciclo estral. Com relação à concentração plasmática de progesterona, ratas em metaestro controle apresentaram concentração mais elevada comparadas às demais fases. O estresse induziu aumento e queda respectivamente no metaestro e no proestro. Desta forma, o sexo e o ciclo estral influenciaram a mobilização tecidual de glicogênio, a glicemia, a concentração plasmática de triglicédeos e a secreção de corticosterona. Também, o ciclo estral influenciou a secreção de estradiol e progesterona após estresse agudo por natação.

ABSTRACT

The aim of this work was to analyze the influence of the sex and of the estrous cycle in the metabolic and hormonal responses from rats submitted to acute stress. Bilaterally ovariectomized rats with 3 months of age, males and females, with regular estrous cycle, were used (n = 7-11/grupo). After the identification of the phase of the estrous cycle, manipulation (male) or 21 days after the ovariectomized, the animals were submitted to one swimming session. Immediately after the stress session, the animals were sacrificed under anesthesia for collection of the blood and tissues. These procedures were also done in control animals. Samples of liver, cardiac, soleus, red and white gastrocnemius muscles were used for glycogen determination (phenol-sulphuric method). After the collection of blood and centrifugation, the plasma was used for determination of the concentration of glucose, triacylglycerol, corticosterone, estradiol and progesterone. The plasmatic glucose and triacylglycerol levels were determined by enzymatic-colorimetric assay. The hormonal determinations were made by radioimmunoassay. The data were analyzed by bifactorial ANOVA followed of the Tukey test with level of significance 5%. Male and Female rats in diestrus and ovariectomized control presented higher concentration of hepatic glycogen when compared to the other phases of the estrous cycle. Swimming induced a decreased in this parameter in all groups. Metestrus control rats presented lower glycogen concentration compared to the other control groups. Stress caused its mobilization in all the groups, but not in females at metestrus. Control male and female rats at proestrus showed respectively higher and lower concentration of glycogen in the soleus muscle compared to the other groups. Swimming stress decreased these levels only in males and female rat at estrus. Male and females ovariectomized rats presented higher basal concentration of glycogen in the muscles gastrocnemius red and white, compared to the other control groups. In this tissue the stress induced reduction in the glycogen concentrations in all groups. Control female rats at metestrus presented glucose plasmatic higher in relation to other control groups. After the swimming session, males and ovariectomized and at proestrus and diestrus females presented an increase in this parameter, without alteration in females at estrus and metestrus. Control female at diestrus presented higher plasmatic concentrations of triacylglycerol compared to the other control groups. In males, females at proestrus,

estrus and metestrus swimming stress increased this parameter, and reduced it at diestrus female rats. Rats at metestrus presented higher plasmatic concentration of corticosterone compared to other control groups. After the stress, there was an increase in this parameter in all groups, validating the model of stress used. However this increase was lower in males. The basal concentration of estradiol was higher in rats at proestrus compared to the other control groups. After swimming stress the levels of this hormone increased in females at proestrus at control proestrus, without changes in the other groups. Rats at metestrus presented higher plasmatic concentration of progesterone compared to the other phases. Stress increased and decreased this hormone levels respectively at metestrus and proestrus. In summary, the sex and the estrous cycle influenced the tissue glycogen mobilization, glucose and triacylglycerol and corticosterone secretion after acute stress. Also, the estrous cycle influenced the estradiol and progesterone production after acute swimming stress.

1. INTRODUÇÃO

Os principais mediadores da reação de estresse são as catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) liberadas pelo sistema nervoso simpático e pela medula da supra-renal, e os glicocorticóides liberados pelo córtex desta glândula. As catecolaminas e os glicocorticóides iniciam eventos celulares que promovem mudanças adaptativas em células e tecidos, com a função de proteger e promover a sobrevivência do organismo (McEwen, 2000). Estas e outras alterações hormonais e comportamentais desencadeadas por estímulos estressores são influenciadas por características individuais tais como fatores genéticos (Marple *et al.*, 1972), idade (Riegle, 1973), sexo (Anishchenko & Gudkova, 1992; Paré & Redei, 1993) e fase do ciclo reprodutivo (Bianchi *et al.*, 2002; Tanno *et al.* 2002).

Em ratas, o ciclo reprodutivo é chamado de ciclo estral, e é composto por quatro fases: proestro, estro, metaestro e o diestro (Long & Evans, 1922; Young *et al.*, 1945), ao longo das quais ocorrem variações dos níveis plasmáticos de corticosterona e de esteróides sexuais (Smith, 1975). O estresse pode influenciar a liberação destes hormônios (Shors *et al.*, 1999) e os esteróides sexuais também podem influenciar a resposta do organismo frente a estímulos aversivos.

Para o estudo da reação de estresse usando animais de laboratório, há vários protocolos propostos na literatura, como por exemplo, a natação. Esta é considerada um agente estressor para roedores de laboratório devido ao exercício físico, à novidade que este estímulo representa para o animal e à impossibilidade de fuga, somada à iminência de morte (Östman-Smith, 1979; Cox *et al.*, 1985; Garcia-Marquez & Armario, 1987). Bruner & Vargas (1994) demonstraram que a movimentação do animal na água parece estar negativamente correlacionada às suas chances de sobrevivência. Assim sendo, a diminuição da movimentação representaria uma resposta adaptativa.

Durante o exercício físico, e portanto durante a natação, ocorre aumento na secreção de glucagon, que promove a liberação de glicose armazenada sob a forma de glicogênio hepático para o sangue. Ocorre também aumento do catabolismo de gorduras e redução dos níveis plasmáticos de aminoácidos (Felig *et al.*, 1972; Farias-Silva *et al.*, 1999; Mcardle *et al.*, 1998). Estas respostas fisiológicas visam fornecer ao Sistema Nervoso Central (SNC) e

Introdução

aos músculos em atividade maior aporte de substratos energéticos. Estes ajustes metabólicos são também estimulados pelas catecolaminas, glicocorticóides e esteróides sexuais.

A influência do ciclo reprodutivo e dos esteróides sexuais nos diferentes sistemas orgânicos tem sido muito estudada a fim de se compreender a relação entre os hormônios sexuais, o sistema cardiovascular, as alterações emocionais e comportamentais relacionadas ao ciclo reprodutivo e o estresse (Shors *et al.*, 1999; Bianchi *et al.*, 2001; Tanno *et al.* 2002). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar em ratos a influência do ciclo estral e do estresse por natação sobre a mobilização de reservas energéticas, a secreção de corticosterona, progesterona e estradiol.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do sexo e do ciclo estral sobre as respostas metabólicas e hormonais de ratos e ratas submetidos ao estresse agudo por natação através da análise da mobilização do glicogênio hepático e cardíaco e dos músculos esqueléticos (sóleo, gastrocnêmio vermelho e branco), concentrações plasmáticas de glicose e triglicerídeos e na secreção de corticosterona, progesterona e estradiol.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ESTRESSE

Experimentos de Hans Selye datados do início do século XX auxiliaram na compreensão do termo estresse. Pesquisando os efeitos de um extrato químico, este pesquisador observou o desenvolvimento de úlceras gastro-intestinais, atrofia do sistema imune e aumento das glândulas adrenais em ratos. Porém, para sua surpresa, os ratos do grupo controle, que haviam recebido injeções de solução salina, apresentaram alterações semelhantes. Selye concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções e não aos efeitos do extrato químico. Encontrou os mesmos resultados expondo animais ao frio, a patógenos, a toxinas ou ao barulho (Selye, 1936; Sapolsky, 1990). Estas três alterações receberam o nome de tríade morfológica. Com base nestes resultados, Selye (1936) descreveu a Síndrome Geral da Adaptação, que representava uma reação geral e inespecífica do organismo a estímulos aversivos ou a situações desconhecidas que pudessem ameaçar a homeostasia, cuja finalidade seria a adaptação do animal à nova condição (Selye, 1936; Koolhaas *et al.*, 1999). Segundo a definição original, proposta por Selye (1936), estresse representa a resposta do organismo, enquanto que o seu agente causador é definido como estímulo ou agente estressante ou estressor (Pickering, 1981; Kopin, 1995).

Esta reação é trifásica: a fase de alarme ou excitação ocorre quando o organismo reconhece o estímulo como estressante, e caracteriza-se por aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor. Se o estímulo for mantido, o organismo desenvolve mecanismos adaptativos (fase de resistência). Quando essa adaptação não ocorre, desenvolve-se a fase de exaustão, na qual o organismo torna-se susceptível a patologias, como por exemplo, distúrbios renais, cardiovasculares, gastrointestinais e/ou imunológicos (Selye, 1936). É nesta fase de exaustão que o estresse contribui direta ou indiretamente para muitas patologias, como por exemplo doenças coronárias, neoplasias, complicações respiratórias e depressão. Também pode agravar outras condições já existentes, como: herpes, esclerose, diabetes, doenças mentais, alcoolismo, abuso de drogas, discórdias familiares e violência, sendo conhecido por psicólogos e psiquiatras como o assassino silencioso (Briner, 1997).

Porém, a reação de estresse visa a manutenção da homeostase (Kopin, 1995) e tem sido fundamental para a seleção natural, aumentando a capacidade de sobrevivência dos organismos (Nesse & Young, 2000). A adaptação dos seres vivos frente aos inúmeros estímulos ambientais a que estão constantemente expostos é a finalidade desta reação, sendo que em casos em que ela não ocorra poderia resultar em doenças (Fraser *et al.*, 1975; Chrousos & Gold, 1992; Koolhaas *et al.*, 1999).

Embora Hans Selye (1936) tenha descrito a reação de estresse como sendo uma resposta inespecífica, este postulado foi revisto por diferentes autores, segundo os quais, a intensidade das respostas e as estruturas ativadas variam com a qualidade e intensidade do estímulo estressor (Mason, 1968a, b; Pacak *et al.*, 1998).

Frente a um estressor, a alteração fisiológica inicial decorre da decodificação da informação sensorial pelo sistema límbico, em associação com áreas corticais do cérebro (Eliot, 1992). As principais alterações centrais incluem a facilitação de vias neurais relacionadas ao estado de alerta, cognição e inibição de outras como as do comportamento sexual e do crescimento (Caldeira, 2001). Dentre as inúmeras alterações hormonais desencadeadas por estímulos estressores, o que a caracteriza é a ativação do sistema de estresse primário, que ocasiona a ativação do eixo sistema nervoso simpático – medula adrenal, resultando em aumento dos níveis plasmáticos das catecolaminas: noradrenalina e adrenalina (Axelrod & Reisine, 1984; Natelson *et al.*, 1988; Chrousos & Gold, 1992; Koob, 1999) e simultaneamente há a ativação do eixo HHA, resultando em aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e de cortisol, no homem e de corticosterona, em ratos (Axelrod & Reisine, 1984; Chrousos & Gold 1992; Koob, 1999).

Muitos pesquisadores definiram modelos animais para o estudo do estresse. Nestes as variáveis externas que poderiam interferir nos experimentos podem ser melhor controladas, em relação a estudos realizados em humanos. Os protocolos animais complementam estudos com seres humanos. Os agentes estressantes podem ser físicos, químicos, sociais, psicológicos ou de ordem interna (metabólicos), e podem ser classificados de acordo com suas características, duração e intensidade. Estressores físicos incluem calor (Pacak & MaCarty, 2000), frio (Taylor, 2000), imobilização (Miyahara *et al.*, 1999), choque (Anderson *et al.*, 1996) e natação (Marcondes *et al.*, 1996; Dal-Zotto *et al.*,

2000; Bianchi *et al.*, 2002). Estressores químicos incluem a exposição ao éter (Suárez *et al.*, 1999), venenos (Chang *et al.*, 1997), insulina (Frier *et al.*, 2000), formalina (Pacak & McCarty, 2000), entre outros. Estressores psicológicos, como a exposição a ambientes desconhecidos e à novidade afetam profundamente os processos emocionais, e podem resultar em mudanças comportamentais, como ansiedade, medo ou frustração (Ottenweller, 2000). Como exemplo de estressores sociais, citam-se as relações de dominância, no caso de animais, e em humanos, de hierarquia nas relações de trabalho, além de fatores como desemprego, separação conjugal, perda de entes queridos (Flüge, 1996; Haller *et al.*, 1999; Zelena *et al.*, 1999). Porém, esta classificação dos tipos de agentes estressores não indica a presença apenas de um tipo, apenas estabelece uma predominância de um sobre os demais, pois a maioria dos estressores utilizados na pesquisa animal inclui estímulos que apresentam simultaneamente componentes físicos, químicos e emocionais (Pacak & McCarty, 2000).

Diferentes estressores causam uma heterogeneidade das respostas neuronais, neuroendócrinas e comportamentais, pois dependendo do modelo utilizado poderá ocorrer ativação de estruturas cerebrais diferentes com circuitos neuronais distintos (Palkovits, 2000), e as alterações adaptativas que levam ao redirecionamento das fontes de energia e mudanças no padrão de comportamento, durante a exposição ao estímulo estressor, dependem das estruturas cerebrais e vias neurais ativadas.

Um dos modelos muito utilizado é o estresse por privação de água (Ryan *et al.*, 1993). Neste modelo o animal fica privado da ingestão de água por um período prolongado, sendo recrutadas vias neurais que permitam a ativação vasopressinérgica. Um outro modelo relacionado à dieta é a privação de sal, que favorece a ativação do sistema angiotensina-aldosterona, aumentando a reabsorção de sódio pelos túbulos renais (Krieger *et al.*, 1990).

A exposição dos animais ao frio, consiste na exposição dos mesmos a temperaturas abaixo da habitual. Este modelo é utilizado por pesquisadores para o estudo dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento de úlceras gastrointestinais (Popovic & Popovic, 1999). Outro modelo descrito na literatura é a imobilização, que consiste em imobilizar os quatro membros de um rato e colocar a cabeça em anéis de metal para impedir o sua movimentação. A duração e a frequência do estímulo estressor variam

conforme os diversos protocolos experimentais. A imobilização é um estressor complexo que apresenta componentes físicos e psicológicos. A tentativa de escapar e a contração muscular associadas representam uma intensa forma de exercício físico (Kvetnasnky & McCarty, 2000).

O protocolo de dor causado pela administração de formalina no animal pode ser utilizado para indução de estresse. Neste teste utiliza-se a formalina (preparada a base de solução de formaldeído), administrada no animal para indução de dor (Dubuisson *et al.*, 1997; Clavelou *et al.*, 1995; Palkovits *et al.*, 1995; Domingos *et al.*, 2000)

Outro modelo muito utilizado e definido como protocolo de estresse é a natação, que constitui um estímulo estressor devido à necessidade de ajustes fisiológicos para a realização do exercício físico. Além disso, também é um estressor emocional devido à ameaça de morte por afogamento e por se caracterizar por uma situação desconhecida e não permite fuga para o rato de laboratório (Östman-Smith, 1979; Cox *et al.*, 1985; Garcia-Marquez & Armario, 1987). Ao ser colocado na água pela primeira vez, o rato rapidamente passa a nadar em torno das bordas do tanque, aparentemente procurando escapar, e este comportamento foi denominado de “tentativa de fuga” (Bianchi *et al.*, 2002). Depois de alguns minutos seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, o maior tempo possível (Bianchi *et al.*, 2002). Bruner & Vargas (1994) demonstraram que a atividade de ratos durante a sessão de natação varia com a temperatura da água e que a movimentação do animal parece estar negativamente correlacionada às suas chances de sobrevivência. Dados obtidos por Bianchi *et al.* (2002) demonstraram menor tempo de imobilidade e maior taxa de defecação em ratos submetidos a 35°C do que a 25°C e 30°C, sugerindo maior nível de estresse em ratos submetidos a 35°C do que a 25°C e 30°C.

Com relação à duração, os estímulos estressores podem ser agudos ou crônicos. As respostas adaptativas a um estressor agudo incluem processos fisiológicos e comportamentais que são essenciais para restabelecer a homeostasia. Durante uma resposta ao estresse agudo, os processos fisiológicos são importantes para inibir ou estimular a mobilização e redirecionamento das reservas energéticas entre os vários órgãos (Pacak & McCarty, 2000).

Estudos mostram que a exposição a estressores agudos tem efeitos de longa duração. Van Dijken (1993) demonstrou que o estresse por choque nas patas produziu efeitos sobre o eixo HHA e no comportamento destes animais, que perduraram por 14 dias após a aplicação do estímulo. Nakashima *et al.* (2002) submeteram animais a sessão única de imobilização e observaram aumento nos níveis de ACTH até 6 dias após o estresse.

No caso do estresse crônico, as elevações nos níveis de glicocorticóides mantidas por longo período podem ter efeitos deletérios para o organismo, que envolvem alterações na síntese de receptores para glicocorticóides (Pavlidis *et al.*, 2002), e uma atrofia de neurônios piramidais da região CA3, o que ocasiona diminuição do fluxo de informações que passam por esta região, diminuindo a capacidade de memória espacial (Pavlidis *et al.*, 2002).

Outro fator que pode influenciar a resposta orgânica a estímulos estressores é a idade. Estudos em animais de laboratório confirmam a complexa interação entre estresse e envelhecimento. Em resposta a estressores ocorreu uma maior e mais prolongada liberação de glicocorticóides em indivíduos velhos em relação a jovens. Esta diferença na responsividade adrenocortical está relacionada à diminuição da atividade do sistema de controle da secreção de glicocorticóides em ratos velhos (Riegler, 1973). Desta forma, com a diminuição da retroalimentação negativa, causada pela diminuição do número de receptores para glicocorticóides no SNC, a inibição do eixo HHA estará reduzida, tornando-o mais ativo, proporcionando maior e mais prolongada liberação de glicocorticóides (Sapolsky, 1990).

Muitos fatores individuais tais como características genéticas (Marple *et al.*, 1972), sexo (Lescoat *et al.*, 1970; Anishchenko & Gudkova, 1992; Paré & Redei, 1993) e fase do ciclo reprodutivo (Popovic & Popovic, 1999) também influenciam a reação de estresse. Entretanto, o fator mais importante parece ser a percepção que o indivíduo tem do estímulo que lhe é apresentado. Esta percepção depende das experiências previamente vivenciadas pelo mesmo ou filogeneticamente adquiridas pela espécie, e da novidade ou previsibilidade do estímulo (Vogel & Jehsh, 1988; Griffin, 1989).

As características genéticas e individuais podem influenciar a reação de estresse, pois há padrões de personalidade que podem determinar indivíduos mais ou menos

susceptíveis. Além disso, as respostas hormonais a estímulos estressores sofrem influência do sexo e do ciclo reprodutivo, sendo que em ratos adultos, a secreção de ACTH e de corticosterona durante a reação de estresse difere entre machos e fêmeas devido às múltiplas ações exercidas pelos andrógenos e estrógenos em diferentes níveis do eixo HHA (Le Mével *et al.*, 1982; Dupouy *et al.*, 1987). Em resposta à exposição a um ambiente desconhecido (Lescoat *et al.*, 1970) ou ao éter (Kitay, 1961) fêmeas apresentaram um aumento mais rápido da corticosterona plasmática do que machos. Após exposição ao éter, esta elevação foi mais duradoura em fêmeas do que em machos, embora a vida média da corticosterona no plasma de ratas seja menor do que em ratos (Kitay, 1961). O ciclo reprodutivo de ratas também influencia a reação de estresse como veremos a seguir.

3.2 CICLO ESTRAL E ESTRESSE

A rata apresenta vários ciclos reprodutivos ovulatórios anualmente e por este motivo é um animal poliestro. O seu ciclo é chamado de estral. Muito do conhecimento sobre o ciclo ovariano de mamíferos deve-se aos resultados obtidos em estudos realizados sobre o ciclo estral de ratas (Silva, 2001).

A palavra *estro* significa *aflito*; e é uma variação da palavra latina "*oistros*", para definir o período de desejo sexual de fêmeas. As outras fases do ciclo foram denominadas utilizando os prefixos *pro*, *met* e *di* associadas com a palavra *estro*. O ciclo estral é composto por quatro fases: *proestro*, *estro*, *metaestro* e *diestro*, com duração de 12-18 h, 25-30 h, 24-30 h, 28-50 h, respectivamente (Young *et al.*, 1945; Mandl, 1951; Houssay, 1980). Estas fases podem ser identificadas ao microscópio óptico pelos tipos celulares que constituem o epitélio vaginal após coloração (Long & Evans, 1922; Hoar, 1975) ou a fresco (Marcondes *et al.*, 2002), devido às ações hormonais neste tecido. No *estro* há o predomínio de células epiteliais queratinizadas; no *metaestro*, há uma proporção semelhante entre células epiteliais queratinizadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos. No *diestro* são encontrados predominantemente leucócitos e finalmente no *proestro* observa-se o predomínio de células epiteliais nucleadas (Hoar, 1975; Marcondes *et al.*, 2002).

Durante o ciclo estral ocorre variação cíclica dos hormônios sexuais. A concentração plasmática de estradiol é baixa entre o estro e a manhã de metaestro e começa a aumentar na tarde desta fase, alcançando valores mais altos no meio da fase do proestro. No final da tarde deste estágio, as concentrações de estradiol caem rapidamente atingindo valores basais no início da madrugada do estro. Estas variações estrogênicas funcionam como gatilho que iniciam uma cascata de eventos hormonais. Estes terminam com um pico pré-ovulatório de gonadotrofinas e prolactina (Hashimoto *et al.*, 1968; Butcher *et al.*, 1974; Nequin *et al.*, 1979; Freeman, 1988; Silva, 2001).

A progesterona apresenta aumento de suas concentrações plasmáticas durante o anoitecer do proestro. Este aumento ocorre quase que simultaneamente com o pico pré-ovulatório de LH, e retorna às concentrações basais na manhã da fase do estro. Este pico de progesterona é de origem folicular. Um segundo pico deste hormônio, de origem luteal, inicia-se na metade do dia do metaestro. Este é mantido na madrugada do diestro e diminui para os níveis basais no início da manhã desta fase (Freeman, 1988; Silva, 2001).

Os níveis de LH são mantidos baixos durante as fases do metaestro e diestro até o início da tarde do proestro, quando se elevam. Este aumento rápido de LH induz à ruptura do folículo e à ovulação. As menores concentrações plasmáticas deste hormônio ocorrem durante a madrugada da fase do estro, imediatamente após a ovulação. (Freeman, 1988; Silva, 2001).

O padrão de secreção de FSH no ciclo estral é similar ao de LH. Os níveis basais deste hormônio são observados desde a noite do estro até o início da tarde do proestro, quando ocorre um aumento de sua secreção juntamente com a de LH. As concentrações de FSH, assim como de LH começam a diminuir após o pico. Porém na madrugada do estro, ocorre um pico secundário de FSH. Após este pico, as concentrações deste hormônio começam a diminuir até alcançar suas concentrações basais no início da noite do estro (Freeman, 1988; Silva, 2001).

Estas alterações hormonais possibilitam a ocorrência da ovulação durante o estro, fase em que a fêmea está receptiva ao macho. Caso não ocorra a fecundação, um corpo lúteo pequeno e transitório, forma-se durante o metaestro e regride no diestro. O útero, que se apresenta rosado e preenchido por fluidos durante o estro, torna-se fino e anêmico no

diestro. Durante o proestro, novos folículos se formam e o útero novamente aumenta de volume em preparação para uma possível implantação durante o estro seguinte (Hoar, 1975).

As variações das concentrações dos hormônios sexuais que ocorrem durante o ciclo estral também influenciam funções que não estão diretamente relacionadas à reprodução. A temperatura retal de ratas, por exemplo, é maior durante o proestro quando comparada às outras fases do ciclo. Isto é devido à ação da progesterona que eleva o ponto fixo hipotalâmico, e ativa mecanismos termogênicos periféricos, como tremor muscular (Marrone, 1976). Também foi observada maior síntese cerebral de dopamina e noradrenalina durante o proestro em relação ao diestro (Zschaeck & Wurtman, 1973). Popovic & Popovic (1999) observaram maior resistência de ratas em metaestro em desenvolverem úlcera quando comparadas às demais fases do ciclo estral, após exposição ao frio.

Outros estudos evidenciam a influência do ciclo estral no comportamento não diretamente relacionados à reprodução. A taxa de defecação de ratas submetidas ao teste de campo aberto foi menor no estro comparado as demais fases (Ciocca *et al.*, 1995). Marcondes *et al.* (2001), com a finalidade de avaliar o nível de ansiedade em ratas controle no teste do Labirinto em Cruz Elevado, observaram que durante o proestro o nível de ansiedade era menor comparado ao diestro. Avistur *et al.* (1995) demonstraram, no teste do campo aberto, que fêmeas foram menos ativas no diestro do que no estro. E, no teste da natação forçada, fêmeas em diestro apresentaram maior imobilidade em relação a fêmeas em estro (Marvan *et al.* 1996; 1997).

Com relação à reação de estresse, as fases do ciclo estral influenciam a ativação do eixo HHA. A exposição a choques nas patas (Pollard *et al.*, 1975) ou à imobilização (Viau & Meaney, 1991) durante o proestro resultou em aumentos maiores nas concentrações plasmáticas de corticosterona do que durante o estro e o diestro. Já Baron & Brush (1979) observaram aumento significativo na corticosterona plasmática, após estresse por imobilização, apenas durante o estro.

Marcondes *et al.* (1998) mostrou que ratas sacrificadas em estro submetidas a três sessões de natação apresentaram uma elevação maior na concentração plasmática de

corticosterona, em relação a ratas sacrificadas no diestro. Uma das explicações poderia estar relacionado com o aumento do número de receptores para glicocorticóides no SNC mediada pelo estradiol (Handa *et al.*, 2000). Miller & Sita (2000) propuseram que o estrógeno aumenta a atividade do eixo HHA inibindo a retroalimentação negativa da corticosterona no hipocampo, desta forma haveria um aumento da secreção de corticosterona.

Redei *et al.* (1994) demonstraram através da análise hormonal a ação dos estrógenos na regulação rápida da secreção de glicocorticóides. Esta regulação rápida do feedback do ACTH é influenciada por hormônios ovarianos. Eles relataram uma diminuição da capacidade de regulação do eixo HHA em ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona usando o modelo de estresse por choque nas patas. Ratas que apresentam concentração de hormônios sexuais mais elevados tem uma menor regulação, quando comparado a ratas ovariectomizadas. Embora o estímulo estressor usado por estes pesquisadores seja diferente, eles mostram que os estrógenos facilitaram a regulação da liberação dos hormônios ACTH e corticosterona.

Além da influência dos esteróides sexuais sobre a ativação do eixo HHA, em situações aversivas, foi demonstrado que os hormônios liberados durante a reação de estresse, como o CRH, ACTH, corticosterona e noradrenalina podem afetar a secreção gonadal de esteróides sexuais, alterando as funções reprodutivas (Adler *et al.*, 1983).

A exposição a estressores, dependendo do tipo e duração do estímulo estressor, pode aumentar ou reduzir os níveis de estrógeno e progesterona em ratas, e isto também é influenciado pelas fases do ciclo estral. As exposições do animal à natação e ao frio elevam as concentrações de estradiol, enquanto que o estresse crônico por imobilização em ratas promove diminuição dos níveis de estradiol (Shors *et al.*, 1999). E as concentrações plasmáticas de progesterona aumentaram em fêmeas em estro e em diestro após a sessão de choque nas patas (Marcondes *et al.*, 1998) e estes hormônios apresentam uma intervenção nas funções metabólicas, como veremos a seguir.

3.3 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO DOS MAMÍFEROS

Define-se metabolismo com sendo uma atividade celular dirigida e coordenada, na qual ocorrem inúmeras reações químicas, mediadas pela ação enzimática. Estas reações apresentam dois objetivos principais: obtenção de energia química e síntese de moléculas celulares (Lehninger, 2002). Durante o processo digestivo, macromoléculas ingeridas são degradadas em moléculas menores para serem absorvidas durante o seu curso pelo intestino. Após este processo, estas serão captadas pelas células do organismo onde sofrerão processos para síntese de novas macromoléculas essenciais para o indivíduo ou para liberação de energia (Guyton, 1995; Friedman, 1986).

Um dos órgãos principais no processo metabólico é o fígado, que atua como um importante centro de formação de novas moléculas captadas durante o processo absorptivo (Myers, 1991; Radziuk, 2001). Numa dieta rica em carboidratos, a degradação destes levará à formação de grande quantidade de glicose (Lavoie, 2002) que, ao ser captada pelo fígado, será fosforilada pela enzima glicocinase, formando glicose-6-fosfato (Radziuk, 2001), podendo ser alocada em cinco vias metabólicas distintas, como veremos na figura 1.

Uma das vias é a desforilação da glicose-6-fosfato em glicose, tornando-a disponível para voltar a corrente sangüínea, mantendo a glicemia dentro de condições que possibilite o indivíduo exercer suas funções (Borba-Murad, 1998). Porém, quando a taxa de glicose no sangue está normal, a glicose-6-fosfato é transformada em glicogênio e armazenada no fígado, como um polissacarídeo de reserva (Radziuk, 1997). A terceira via corresponde a glicólise, transformando-a em substrato do ciclo do ácido cítrico (Lehninger *et al.*, 2002).

Caso ocorra uma hiperglicemia, a glicose que não foi utilizada para síntese de glicogênio ou para manutenção da glicemia, será degradada pelo processo de glicólise e formará Acetil Coa, que servirá para a produção de precursores para a síntese de lipídios. Estes serão formados pela associação de ácidos graxos com triglicerídeos, aumentando a reserva adiposa do organismo. E numa última situação, esta glicose poderá participar da formação de d-ribose-5-fosfato, importante precursor na biossíntese de nucleotídeos (Lehninger *et al.*, 2002).

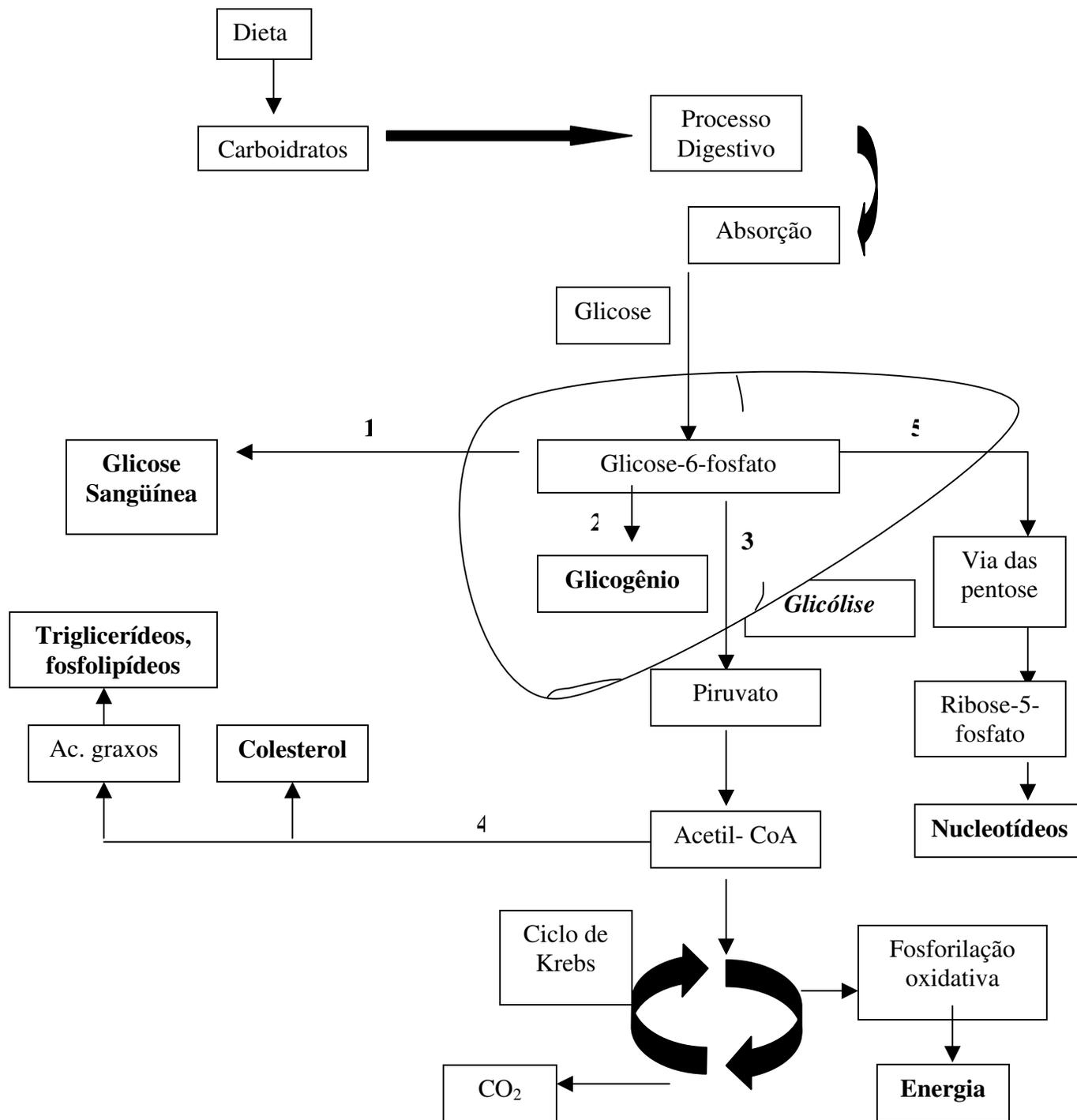


Figura 1. Metabolismo da glicose no fígado e sua distribuição para o organismo.

Uma das vias mais importantes é a formação do glicogênio (Blawacka *et al.*, 1978). Em animais o glicogênio é o principal polissacarídeo de reserva e a sua presença é muito importante na regulação da glicemia nos períodos entre as refeições e em situações de exercício físico e estresse. Os dois maiores reservatórios de glicogênio em mamíferos são o fígado e os músculos esqueléticos. Este polissacarídeo é estocado na forma de grânulos citoplasmáticos altamente hidratados, o que facilita sua rápida mobilização (Blawacka *et al.*, 1978). Durante sua síntese ocorre a participação da enzima glicogênio sintase (Shulman *et al.*, 1995), que se apresenta sob duas formas: *a* e *b*. Quando na forma *a*, possui alta atividade e participa do processo de formação do glicogênio, porém quando apresentada na forma *b* está inativa. No processo de degradação do glicogênio, a enzima atuante é a glicogênio fosforilase, tendo ação contrária à sintase (Brau *et al.*, 1997; Radziuk, 2001) O glicogênio muscular atua como importante reserva energética para a sua própria utilização durante a atividade física, visto que uma vez degradado, haverá a formação de glicose fosforilada, que não é lançada na corrente sanguínea (Blawacka *et al.*, 1978). Já o glicogênio hepático apresenta um papel fundamental na manutenção da glicemia (Lehninger *et al.*, 2002).

O metabolismo muscular possui uma inter-relação com o hepático. Grande parte do oxigênio consumido durante a respiração servirá para a realização de seu trabalho. O músculo esquelético apresenta características que favorecem a rápida mobilização de energia na forma de ATP. Quando o músculo se apresenta em repouso utiliza como substratos os ácidos graxos provenientes da degradação dos triglicerídeos e dos corpos cetônicos originados no fígado pela degradação do excesso de Acetil Coa em situações de hipoglicemia (Lehninger *et al.*, 2002). Durante a atividade física, a principal fonte energética dos músculos é a glicose proveniente da circulação sanguínea, que ao ser captada irá ser fosforilada e entrará no ciclo de Krebs gerando energia para a atividade contrátil do músculo e isto depende do tempo e da intensidade do exercício (Lehninger *et al.*, 2002), como visto anteriormente. Porém, no início da atividade onde há déficit de oxigênio ocorre a utilização da fosfocreatina, que é uma associação da creatina (proteína sintetizada apenas no fígado) e que será transportada pela corrente sanguínea até o músculo, onde formará a fosfocreatina a partir da sua junção com o ATP (primeira fonte de energia

do organismo). Esta é tida como a segunda fonte energética do corpo humano sendo capaz de fornecer energia principalmente em exercícios de curta duração (prova de velocidade) por aproximadamente 10 segundos (Ghorayeb & Barros, 1999).

A captação da glicose pelos músculos em repouso é mediada por receptores do tipo tirosina-quinase que ativarão alguns transportadores. Os receptores do tipo tirosina quinase para insulina apresentam um sítio denominado α . A formação do complexo receptor-hormônio fosforilará a subunidade β que se localiza no interior da célula muscular. Isto ocasionará a externalização dos transportadores de glicose para a porção exterior do sarcolema (Grimm, 1999; Niklasson, 2000). Estes transportadores são denominados de GLUT e apresentam inúmeras isoformas, que facilitam a difusão da glicose para o interior das células, apresentando afinidades diferentes para a glicose. No repouso, a isoforma mais presente é o GLUT1 e estão alocados na membrana plasmática da célula (Hansen *et al.*, 1995). Nestas condições basais, os transportadores GLUT4 estão localizados no meio intracelulares e são externalizados por estímulos, como a insulina e o exercício físico. Sobre a ação destes estímulos, haverá rapidamente a difusão das vesículas contendo estes transportadores para a membrana plasmática, aumentando a população disponível para o transporte da glicose (Cushman *et al.*, 1980; Niklasson, 2000). Desta forma, a glicose é captada pelo músculo e poderá atuar no processo de formação de glicogênio.

O músculo apresenta-se constituído por dois tipos de fibras: as vermelhas e as brancas. As primeiras apresentam contração lenta, alta capacidade oxidativa, abundante irrigação sanguínea, metabolismo energético predominantemente aeróbico e são solicitadas em exercícios de baixa intensidade (Mcardle *et al.*, 1998; Ghorayeb & Barros, 1999).

Por outro lado, as fibras do tipo branca, apresentam velocidade de contração elevada e estão envolvidas em atividades de alta intensidade por um período de tempo reduzido (Saltin *et al.*, 1977). Diferente das vermelhas, apresentam alta capacidade glicolítica, facilitando a mobilização do glicogênio tecidual para sua própria utilização. Não apresentam concentrações elevadas de triglicerídeos e menor irrigação sanguínea do que as fibras vermelhas (Ghorayeb & Barros, 1999). O tipo de fibra ativada depende da intensidade do exercício físico e do tipo de metabolismo energético recrutado.

Porém, caso a glicose torne-se escassa no organismo, poderá ocorrer um processo denominado de gliconeogênese que ocorre principalmente no fígado e músculo esquelético (Lehninger *et al.*, 2002). Assim, haverá formação de glicose a partir de outros precursores que não sejam as hexoses, tais como lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos. Esta é uma das maiores contribuições para a formação de glicose e glicogênio no organismo, atuando como importante forma para obtenção de energia.

Outro mecanismo para obtenção de energia é a utilização de aminoácidos. Estes agem como precursores para a síntese protéica em vários tecidos, como por exemplo, no fígado (Ritcher *et al.*, 1984). Da mesma forma que a glicose, podem participar no processo de formação de nucleotídeos e dependendo das necessidades do organismo, poderiam participar na degradação em Acetil-CoA ou na via do ácido cítrico. Nesta haverá algumas alternativas, podendo ser armazenado na forma de lipídeos, produzindo energia ou compostos com uréia (Lehninger *et al.*, 2002), conforme a figura 2.

Os lipídios apresentam vias bioquímicas complexas e com inúmeras alternativas, dependendo da necessidade do organismo. Os triglicerídeos são compostos por três moléculas de ácidos graxos associados a uma de glicerol. Esta forma de armazenamento de energia apresenta várias vantagens sobre o do glicogênio. Devido a natureza dos carbonos que compõe os ácidos graxos, há uma liberação de energia duas vezes maior que a liberada pelos açúcares. Outra vantagem estaria no fato dos triglicerídeos apresentarem uma característica hidrofóbica, não necessitam estarem hidratados para o transporte como os polissacarídeos, agilizando o transporte e captação por outros tecidos, como por exemplo, pelos músculos (Lehninger *et al.*, 2002). Eles podem ser degradados em ácidos graxos e glicerol. Os primeiros são enviados ao fígado, podendo ser armazenado na forma de tecido adiposo neste órgão. Eles podem sofrer o processo de oxidação entrando no ciclo do ácido cítrico para obtenção de energia (Grimm, 1999). O excesso de Acetil-Coa, formado na oxidação é transformado em corpos cetônicos e apresentam importante função na formação do colesterol, que será utilizado na biossíntese de membranas e hormônios ou podem ser incorporados ao tecido adiposo, como reserva de energia (Lehninger *et al.*, 2002). Parte deste ácido graxo se liga a soroalbumina e será utilizado pelo coração como principal substrato para fornecimento de energia (Moreau *et al.*, 1978).

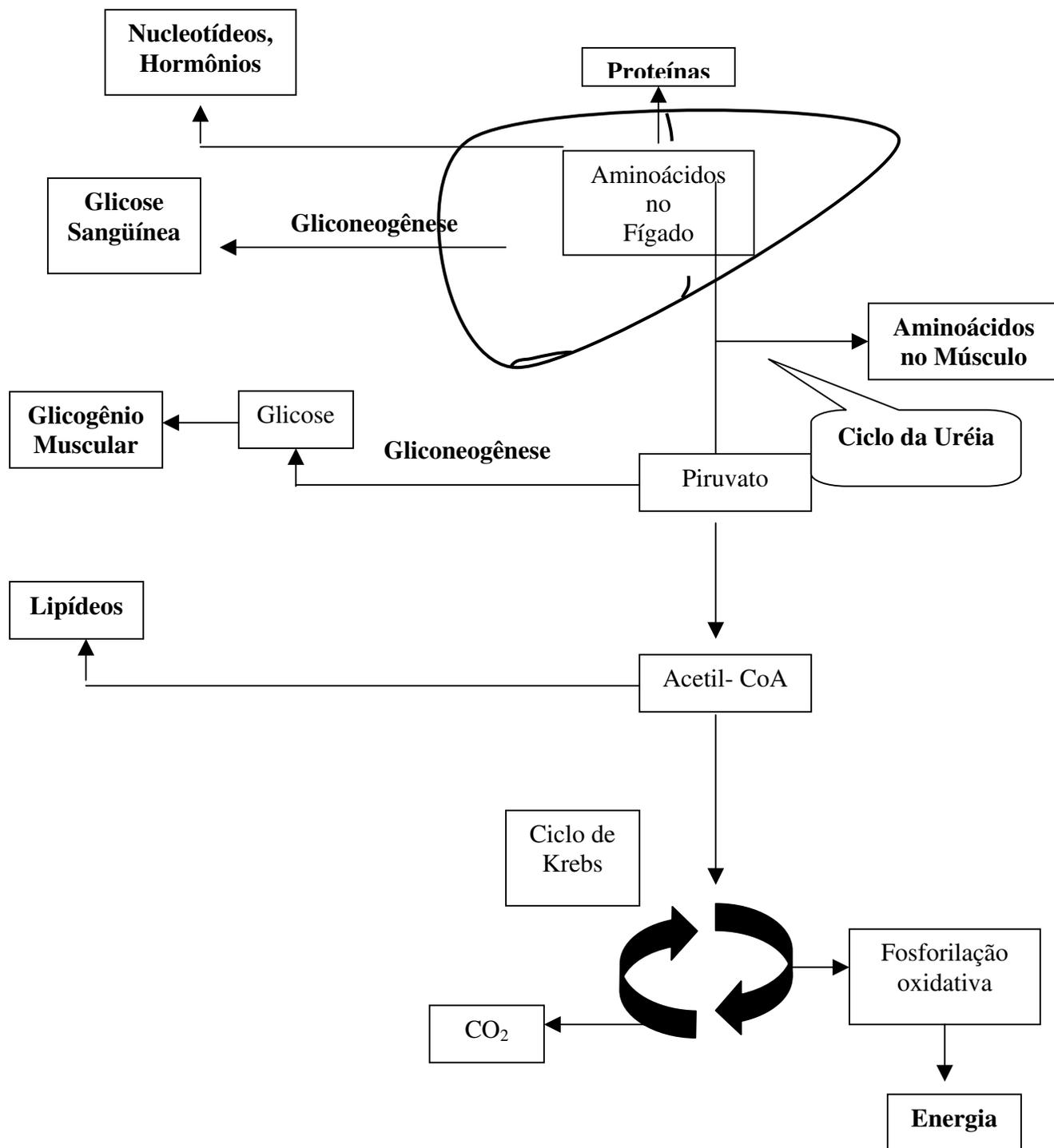


Figura 2. As vias de proteínas e aminoácidos no metabolismo.

Os triglicerídeos representam uma importante fonte de energia durante exercícios longos, sendo que sua oxidação aumenta progressivamente durante a atividade pela enzima triacilglicerol lipase (Horowitz, 2000) e o glicérol plasmático (Lin, 1977), poderá ser utilizado como substratos para a gliconeogênese ou para a síntese de triglicerídeos (Pittner *et al.*, 1985; Brindley *et al.*, 1988; Souza *et al.*, 1996), conforme a figura 3.

Veremos, no próximo tópico desta revisão, como os hormônios liberados durante a reação de estresse e os esteróides sexuais podem alterar o metabolismo.

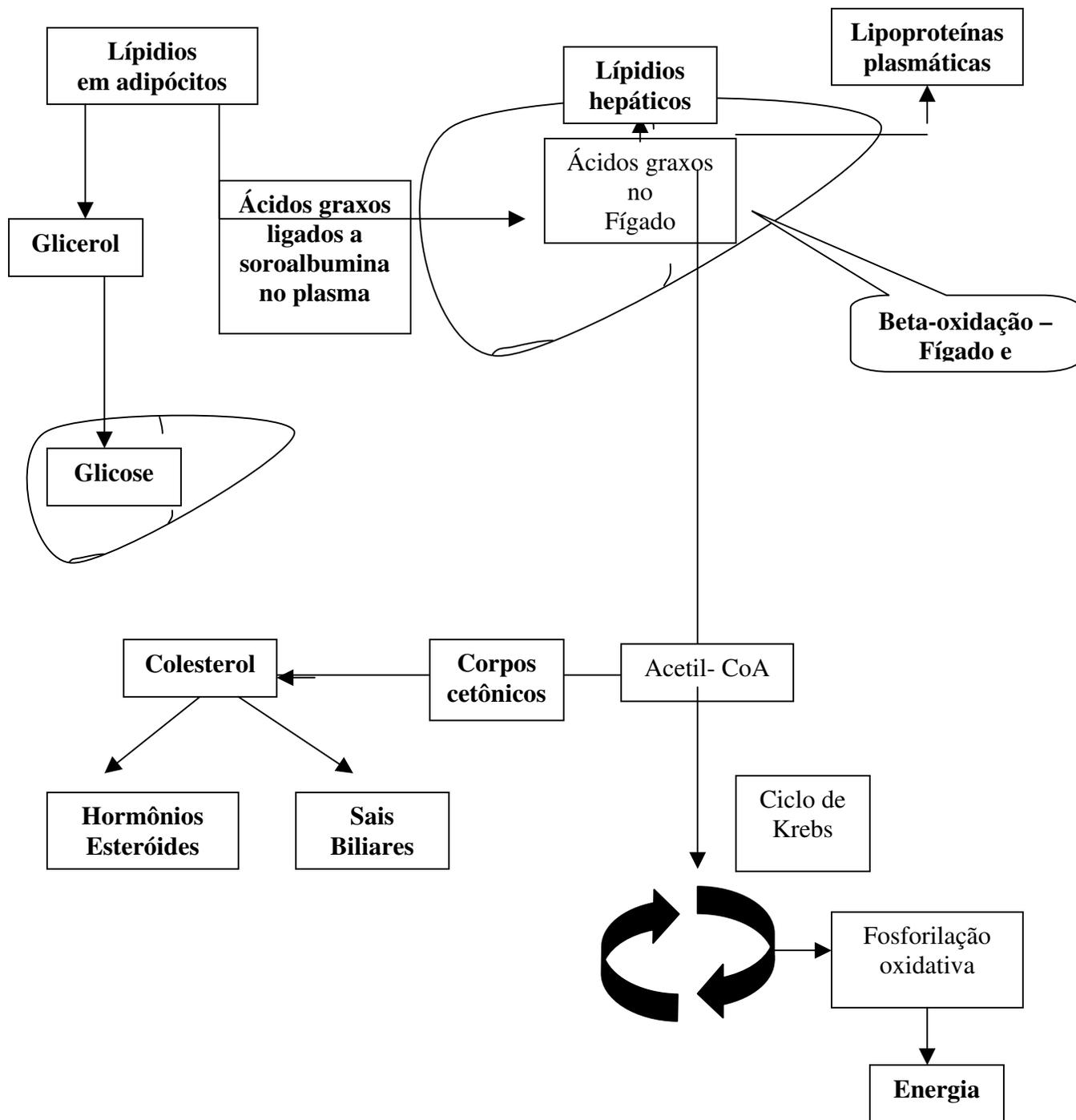


Figura 3. As vias dos lipídios no metabolismo.

3.4 RESPOSTAS METABÓLICAS ATIVADAS POR HORMÔNIOS.

Os processos de síntese e degradação do glicogênio são controlados por sistemas enzimáticos complexos, descritos no item anterior e regulados por fatores metabólicos e hormonais, através de inúmeras reações (Blawacka *et al.*, 1978). Entre estes hormônios, merecem destaque a insulina, glucagon, os hormônios do estresse e ovarianos.

No pâncreas, as catecolaminas estimulam a liberação de glucagon pelas células alfa das Ilhotas de Langerhans, enquanto inibem a liberação de insulina pelas células beta (Porte, 1969; Porte & Robertson, 1973; Yamaguchi, 1991). A insulina e o glucagon apresentam efeitos opostos, no primeiro há uma tendência de reduzir e o segundo aumentar a glicemia, ambos trabalhando na manutenção da glicemia. As catecolaminas e os glicocorticóides liberados na reação de estresse agem sobre os tecidos adiposo, hepático, pancreático e muscular modificando o metabolismo de carboidratos, com efeitos opostos aos da insulina (Pittner *et al.*, 1985; Brindley *et al.*, 1988; Verago, 2000).

Com relação ao metabolismo de carboidratos, as catecolaminas, principalmente a adrenalina, estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese hepáticas (Radziuk & Pye, 2001). A corticosterona influencia o metabolismo de carboidratos através de sua ação permissiva aos efeitos glicogenolíticos e gliconeogênicos das catecolaminas e do glucagon (Exton *et al.*, 1972).

Durante a natação, um exercício físico, ocorre aumento dos níveis de glucagon. Este é responsável pela ativação da glicogenólise, que promoverá a quebra do glicogênio em glicose, que poderá ser lançada diretamente na corrente sanguínea (Felig, 1972). Como consequência da glicogenólise, haverá diminuição da concentração do glicogênio no fígado para manutenção da glicemia (Wahrenberg *et al.*, 1987; Wasserman *et al.*, 1991). O exercício físico estimula a translocação do transportador de glicose (GLUT4) que estão internalizados no citosol para a membrana plasmática estimulando a captação de glicose pelos músculos (Liu *et al.*, 1996).

Simultaneamente, o exercício físico, promove o catabolismo de gorduras (Felig, 1972). Høeg & Zaasgma (1989) descreveu a participação dos receptores β adrenérgicos na lipólise em adipócitos, podendo ser ativada pelos hormônios do estresse. Com a ativação deste processo haverá a degradação do tecido adiposo em ácidos graxos, glicerol e

triglicerídeos que serão enviados ao plasma (Slavin *et al.*, 1994; Lafontan *et al.*, 1995). O glicerol participará do processo de gliconeogênese, enquanto que os ácidos graxos participarão do processo de β -oxidação no fígado e músculo, liberando energia.

Os triglicerídeos representam uma importante fonte de energia para os músculos durante exercícios longos, sendo que sua oxidação aumenta progressivamente durante a atividade (Horowitz, 2000). O fígado é considerado o principal tecido responsável pela captação de glicerol plasmático (Lin, 1977), que pode ser utilizado como um dos substratos para a gliconeogênese, mas também para a síntese de triglicerídeos de reserva (Pittner *et al.*, 1985; Brindley *et al.*, 1988; Souza *et al.*, 1996).

A síntese hepática de triglicerídeos a partir de ácidos graxos e de glicerol pode ser modulada pelas catecolaminas, pelo glucagon e pelos próprios ácidos graxos, principalmente através da estimulação da atividade enzimática da fosfidato fosfohidrolase (Pauletto *et al.*, 1971; Pittner *et al.*, 1985; Brindley *et al.*, 1988). Tanto a síntese, quanto a atividade desta enzima em hepatócitos são estimuladas por glicocorticóides (Knox *et al.*, 1979; Pittner *et al.*, 1985; Brindley *et al.*, 1988).

Os triglicerídeos em células hepáticas podem ser incorporados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e assim serem liberados para o plasma sangüíneo (Pittner *et al.*, 1985; Titov & Pitsin, 1985; Brindley *et al.*, 1988). A velocidade desta liberação depende da circulação existente no tecido hepático que pode ser influenciada pela ação adrenérgica sobre os vasos sangüíneos (Gardemann *et al.*, 1991). Desta forma, em situações em que ocorrem elevações das concentrações plasmáticas das catecolaminas e dos glicocorticóides, como ocorre em situações de estresse e exercício físico, espera-se um aumento do *turnover* dos elementos lipídicos do metabolismo que pode ser acompanhado ou não de elevações de suas concentrações plasmáticas (Verago *et al.*, 2000).

O aumento dos níveis de corticosterona e catecolaminas promove também o catabolismo protéico, além de facilitar a ação de outros hormônios como o glucagon e atuar como antagonista da insulina (Exton, 1972; Mcardle *et al.*, 1998). O catabolismo protéico aumentará a concentração plasmática de aminoácidos, substratos para a gliconeogênese.

Este redirecionamento metabólico torna disponível maior quantidade de substratos para a atividade celular, o que é imprescindível para a atividade física. Tais

adaptações contribuem para a manutenção da homeostase em situações aversivas, gerando maior aporte de energia, para que dependendo da situação seja deflagrado o comportamento de luta ou fuga (Selye, 1936; Herd, 1991; Radziuk & Pye, 2001).

Porém, não são apenas os hormônios liberados durante a reação de estresse que ativam as respostas metabólicas. Muitos autores demonstraram a participação de hormônios sexuais influenciando-as. Kendrick & Ellis (1991) mostraram o efeito do estradiol no metabolismo de glicogênio em ratos submetidos ao estresse. A administração de estradiol por cinco dias diminuiu a utilização de glicogênio tecidual comparada a ratas castradas sem suplementação, evidenciando que outra forma de energia estaria sendo utilizada. Hackney (1999) sugeriu que os níveis elevados de estrógeno resultam em uma redução na utilização do glicogênio muscular, provavelmente por um aumento do metabolismo lipídico. Estudos demonstraram a presença de receptores para esteróides sexuais em adipócitos, isto evidencia a participação destes hormônios no controle da lipólise e lipogênese (Gray *et al.*, 1985; Rebuffe-Scrive, 1987; Pedersen *et al.*, 1996). Tarnopolsky & Ruby (2001) mostraram que mulheres submetidas a exercício oxidam mais lipídios e menos carboidratos que homens, e desta forma apresentam menor utilização do glicogênio muscular. Os autores ressaltam a importância destes dados e suas implicações futuras em pacientes com diabetes e erros no metabolismo de lipídios.

Entretanto, não é apenas o estradiol que influencia as repostas metabólicas. Muitos estudos mostram a influência da progesterona no metabolismo. Sancho *et al.* (1988) relataram que a progesterona atua no fígado e ativa a enzima glicogênio fosforilase responsável pela quebra deste polissacarídeo de reserva, tendo um efeito glucagon-símile. Campbell & Febbraio (2002) também encontraram uma diminuição nos receptores de GLUT4 no músculo esquelético em ratas castradas tratadas com progesterona. Yamaguchi *et al.* (2002) analisaram a atividade da enzima lipase lipoproteica durante as fases do ciclo estral. Esta enzima é responsável pela degradação dos triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, sendo mais ativa na fase do diestro.

Porém, ainda não há trabalhos que relacionam a influência do sexo e do ciclo estral na mobilização do glicogênio hepático e muscular e nas concentrações plasmáticas

de glicose, triglicerídeos com concentrações plasmáticas de corticosterona, estradiol e progesterona em animais submetidos a estresse agudo por natação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos de acordo com o sexo, fases do ciclo estral e realização da ovariectomia (machos, fêmeas em proestro, estro, metaestro, diestro e ovariectomizadas), e estes grupos foram subdivididos em grupos controle (n=7-11) e estressados (n=7-11).

Os animais do grupo controle foram mantidos no laboratório sem aplicação do estresse por natação, enquanto que aqueles do grupo estresse foram submetidos a uma sessão de natação. Após a aplicação do estímulo estressor ou a permanência no laboratório, os animais foram sacrificados e amostras teciduais e sangue foram coletados para determinação da concentração de glicogênio hepático e dos músculos cardíaco, sóleo e gastrocnêmio branco e vermelho. Também foram realizadas as dosagens plasmáticas de glicose e triglicerídeos. Também foi realizada a dosagem dos esteróides sexuais e da corticosterona, para avaliarmos a relação com o estresse e as respostas metabólicas observadas.

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar SPF (*specific pathogen free*), com 12 a 14 semanas de idade, fêmeas pesando 225 ± 5 g, e machos pesando 320 ± 8 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica CEMIB – UNICAMP e foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, alojados em gaiolas coletivas com no máximo 5 animais, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e com ciclo de claro/escuro de 12/12 h. Receberam água e ração à vontade e foram pesados no dia do experimento. Todos os procedimentos realizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia/UNICAMP (CEEA - protocolo nº 390-1- Anexo 01).

4.3. DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL

A determinação das fases do ciclo estral foi feita diariamente entre 7:30 e 8:30 h, por meio da observação do lavado vaginal, durante no mínimo oito dias consecutivos (dois

ciclos). O lavado vaginal foi coletado com uma ponteira plástica preenchida com 10 μ L de soro fisiológico (solução salina 0,9 %) (Figura 4). Após a coleta, o lavado vaginal foi observado a fresco, ao microscópio óptico, utilizando-se aumento de 10 vezes (Marcondes *et al.*, 2002). A classificação da fase do ciclo estral foi feita pela proporção observada entre o número de células epiteliais nucleadas, células queratinizadas e leucócitos (Hoar, 1975). No estro encontra-se um predomínio de células epiteliais queratinizadas; no metaestro, há uma proporção semelhante entre células epiteliais queratinizadas, epiteliais nucleadas e leucócitos. No diestro são encontrados predominantemente leucócitos e finalmente no proestro observa-se o predomínio de células epiteliais nucleadas (Figura 5) (Hoar, 1975; Marcondes *et al.*, 2002).

As ratas que apresentaram ciclos irregulares, caracterizados por ausência ou permanência em uma das fases além do período normal, foram desprezadas (Drickamer, 1987). Somente ratas que apresentaram ciclos regulares de quatro dias (proestro, estro, metaestro e diestro) foram utilizadas (Smith *et al.*, 1973). Nos dias em que os animais foram submetidos à sessão de estresse, a fase do ciclo estral foi determinada 30 min antes da aplicação do mesmo.

Devido à realização diária do esfregaço vaginal, as ratas habituariam-se à manipulação. Para eliminar a variável de estresse por manuseio entre machos e fêmeas, os machos e ratas castradas foram manipulados por pelo menos 10 dias antes da realização do experimento.



Figura 4. Coleta do lavado vaginal com 10 μ L de salina (Marcondes *et al.*, 2002).

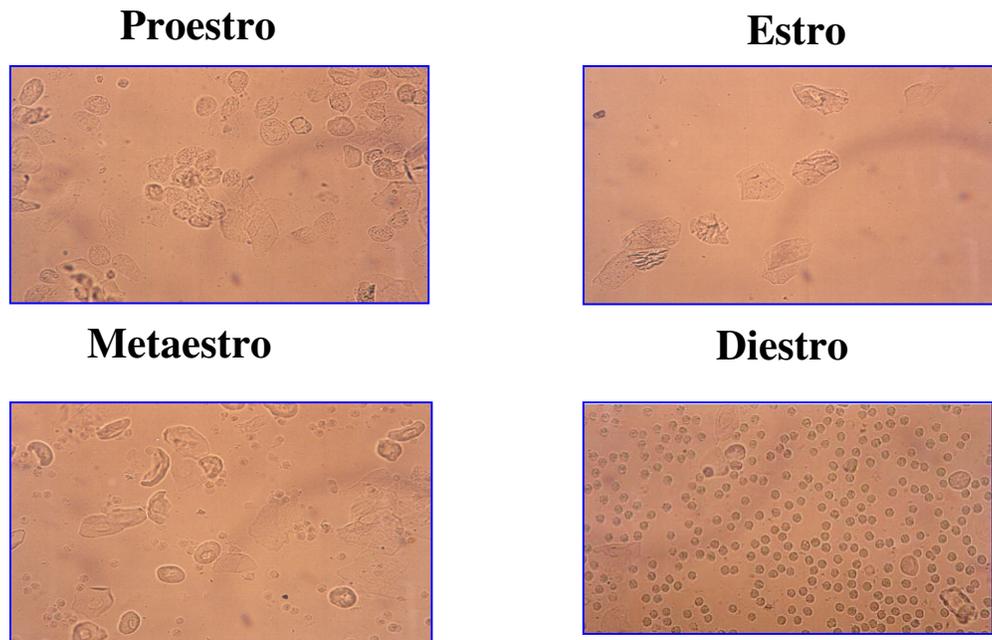


Figura 5. Observação de lâmina a fresco no microscópio óptico, permitindo identificar e quantificar os tipos celulares (Marcondes *et al.*, 2002).

4.4 OVARIECTOMIA

Primeiramente todos animais foram pesados e receberam, via intramuscular, uma solução de cloridrato de xilazina (25 mg/Kg - Rompum[®]; Bayer S.A, São Paulo, S.P, Brasil) e de cloridrato de ketamina (50 mg/Kg - Dopalen[®]; AgribRANDS do Brasil LTDA, Paulínia, S.P, Brasil). Em seguida, foram realizadas tricotomia e anti-sepsia da área operatória com álcool iodado. Dezesesseis ratas foram submetidas à ovariectomia, através de incisões cutâneas bilaterais, divulsionamento do tecido muscular, acesso aos ovários e excisão dos mesmos (figura 6). Para sutura cutânea foram usados pontos interrompidos de fio mononylon 4-0 (Ethicon[®], Johnsons do Brasil SA, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, os animais receberam aplicação única de 1mg/kg de antibiótico via intramuscular (Pentabiótico pequeno porte, Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e analgésico numa única dose de 0.15mg/kg via subcutânea (Dipirona Sódica, Boehringer Ingelheim do Brasil, Itapeccerica da Serra, S.P., Brasil). Onze dias após a realização da cirurgia, as ratas foram submetidas á manipulação diária durante 10 dias.

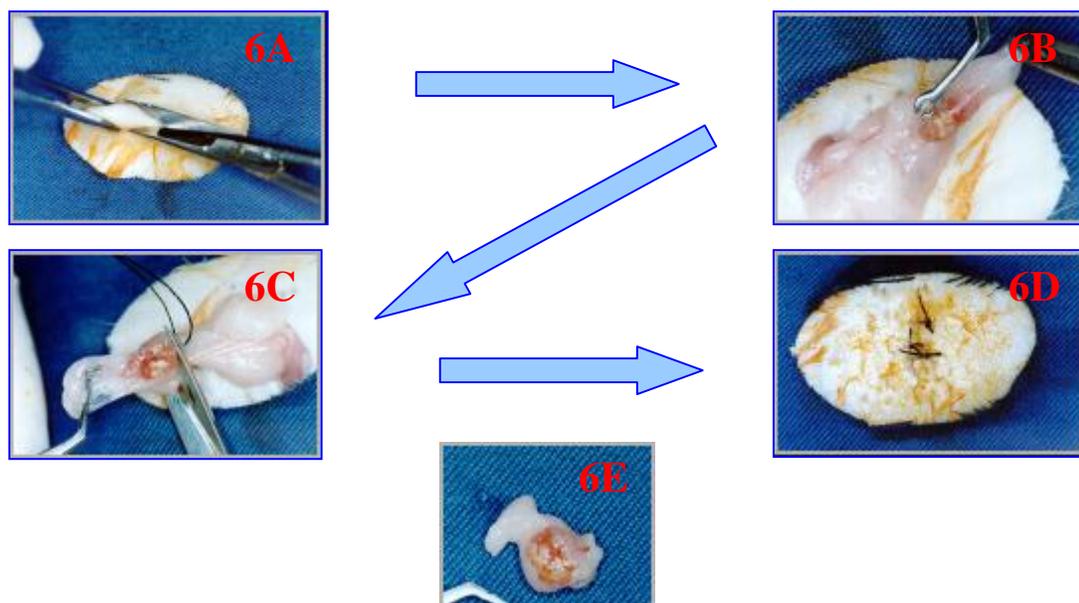


Figura 6. Procedimentos realizados para a ovariectomia: **A-** Incisão na pele após a tricotomia e anti-sepsia. **B-** Exposição do ovário. **C-** Amarrilha do ovário a ser extirpado para evitar hemorragia. **D-** Sutura. **E-** Ovário removido.

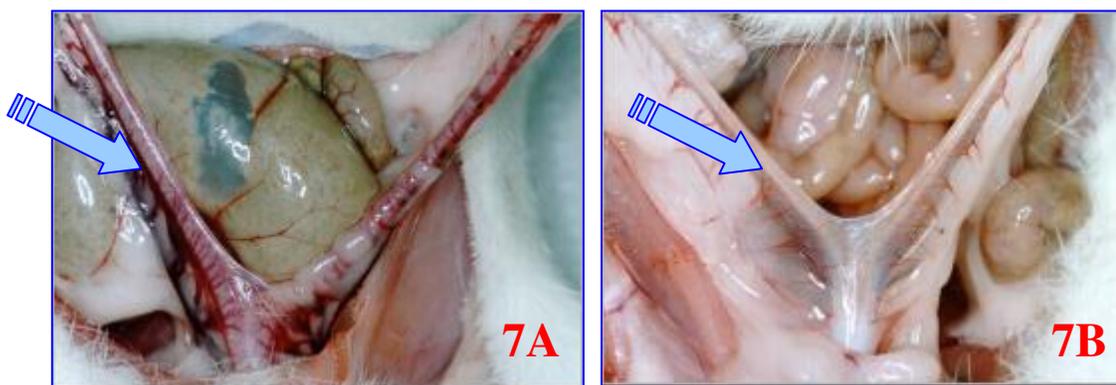


Figura 7. Figura do útero de animais normais e submetidos a ovariectomia **A-** Útero normal; **B-** Útero atrofiado 21 dias após a ovariectomia.

O sucesso da ovariectomia foi confirmado no momento da necrópsia pela análise do útero dos animais. Após o sacrifício, foi observada a morfologia dos cornos uterinos. Estes, na presença de hormônios ovarianos apresentam-se róseo, volumoso e totalmente preenchido por fluido, enquanto que na ausência dos mesmos apresentam-se fino, atrófico e anêmico (Figura 7).

4.5. ESTRESSE POR NATAÇÃO EM ESPAÇO AMPLO

Após ter sido determinada a fase do ciclo estral, ou realizada a manipulação, os animais permaneceram no laboratório por pelo menos 30 minutos, para eliminar o estresse causado pelo transporte à sala de experimentação. Entre 8:00 e 10:00 h, os animais do grupo estresse foram submetidos individualmente a uma sessão de 50 min de natação, em um tanque de acrílico medindo 50 cm x 50 cm x 50 cm, contendo água a uma profundidade de 38 cm, suficiente para evitar que os animais encostassem a cauda no fundo do mesmo (Figura 8). A água foi mantida a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e foi trocada após duas observações (Bianchi *et al.*, 2001). A temperatura ambiente foi mantida a 25°C por um sistema de condicionador de ar quente/frio.

O grupo controle foi mantido na sala de experimentação por 30 min após o transporte e os animais foram sacrificados, sem a realização da sessão de estresse.



Figura 8. Ilustração da sessão de estresse por natação (Bianchi *et al.*, 2002).

4.6. COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais, após terem sido submetidos à sessão de natação ou terem permanecido no laboratório em condições não estressantes, foram anestesiados por inalação de halotano (Tanno, 2002), o sangue foi coletado da veia renal esquerda em seringa contendo anticoagulante EDTA, e centrifugado. Após a coleta de sangue o animal foi sacrificado por parada respiratória sob anestesia. O plasma coletado foi dividido em duas alíquotas. Uma delas foi congelada para determinação dos níveis hormonais. A outra foi mantida em geladeira por um período não superior a quatro horas para dosagem, no mesmo dia, da glicose e triglicerídeos plasmático.

Amostras do fígado e dos músculos cardíaco, gastrocnêmio (vermelho e branco) e sóleo foram obtidas pela determinação do glicogênio tecidual.

4.6.1. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

Em amostras do fígado e dos músculos cardíaco, sóleo, gastrocnêmio vermelho e branco a extração do glicogênio foi realizada pelo método descrito por Lo *et al.* (1970) e a determinação deste polissacarídeo foi realizada pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico. Amostras de 500 mg de fígado e 200 mg de cada músculo foram digeridas em 2 e 1 mL de KOH 30%, respectivamente, em tubos de ensaio mantidos por 15 min em banho fervente. Em seguida, os tubos foram agitados e adicionado Na₂SO₄ saturado (200 µL p/ fígado e 100 µL p/ músculo) para favorecer a precipitação do polissacarídeo. Após nova agitação foi adicionado etanol a quente (7 mL p/ fígado, e 3,5 mL p/ músculo) e os tubos foram centrifugados por 15 min a 3500 rpm, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em água deionizada (25 mL p/ fígado e 5 mL p/ músculo). Em seguida foi preparada uma curva padrão de glicose (0,01 a 0,06 mg/mL). A curva e as amostras foram realizadas em duplicata, e a determinação da absorbância feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. As concentrações de glicogênio são apresentadas em mg/100mg de tecido.

3.5.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GLICOSE E DE TRIGLICERÍDEOS

A glicemia foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico, conforme o teste de GLICOSE E-Enzimática (CAT n° 02200 LABORLAB[®]) (Trinder, 1969). A solução de trabalho do kit comercial após ter sido preparada foi colocada em todos os tubos (1 mL). O reativo padrão foi adicionado aos respectivos tubos (10 µL) e o mesmo volume do plasma foi adicionado aos tubos das amostras. Estas foram mantidas incubadas em água a 37°C por um período de 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm. Estes experimentos foram realizados em duplicatas.

A dosagem plasmática de triglicerídeos foi realizada utilizando-se o kit totalmente enzimático (CAT n° 02700 LABORLAB[®]) (McGowan *et al.*, 1983), semelhante à preparação da determinação da glicemia. Também foi realizada a determinação da absorbância com o mesmo comprimento de onda usado na glicemia.

3.5.3 DOSAGENS HORMONAIS

As concentrações plasmáticas de corticosterona, progesterona e 17 -β- estradiol (estradiol) foram determinadas utilizando-se kits de radioimunoensaio (KIT Amerlex RPA 548)¹

Para dosagem de corticosterona, 10 µL de cada amostra foram diluídos em 200 µL de diluentes específicos para esteróides. Foram utilizadas alíquotas de 100 µL das soluções padrão e das amostras diluídas em duplicatas, às quais adicionaram-se 200 µL da solução com hormônio marcado radioativamente (¹²⁵I-corticosterona). Em seguida, foram acrescentados 200 µL da solução de anticorpo anti-corticosterona. Após agitação, os tubos foram incubados por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 500 µL de solução precipitante e as amostras foram agitadas e centrifugadas, a 2500 rpm por 15 min, para precipitação do complexo antígeno-anticorpo. O sobrenadante foi retirado e a radioatividade do precipitado foi determinada, em contador automático através de

¹ Laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

cintilografia. A concentração de corticosterona nas amostras foi obtida utilizando-se curva padrão para cada ensaio.

Para as dosagens de progesterona e estradiol, 100 µL das soluções padrão e de cada amostra, em duplicata, foram adicionados aos respectivos tubos especiais recobertos com uma camada de anticorpos anti-progesterona e anti-estradiol. A seguir, foi acrescentado 1 mL de hormônio marcado radioativamente: ^{125}I -17β-estradiol ou ^{125}I -progesterona. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria, a $37\pm 1^\circ\text{C}$, por duas horas para progesterona, e por 3 horas para o estradiol. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, e a radioatividade dos tubos foi mensurada. As concentrações das amostras foram determinadas como descrito acima para a corticosterona.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise do efeito do ciclo estral e do estresse nos parâmetros analisados foi utilizada Análise de Variância Bifatorial, com análise dos fatores FATOR 1 e FATOR 2, respectivamente com seis (macho, proestro, estro, metaestro, diestro e ovariectomizadas) e dois (controle e estresse) níveis. Para comparação das médias foi realizado o teste de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

5. RESULTADOS

A análise estatística bifatorial indicou que para todas as variáveis analisadas houve interação significativa entre os fatores fase e tratamento ($p < 0,05$).

Apresentamos na figura 9, os dados referentes à concentração do glicogênio hepático. Considerando animais controle, ratos machos e ratas ovariectomizadas e em diestro apresentaram maior concentração de glicogênio hepático quando comparados às demais fases do ciclo estral. A natação induziu uma diminuição na concentração deste parâmetro em todos os grupos submetidos à sessão de natação. Machos apresentaram uma porcentagem de diminuição de 67%, fêmeas ovariectomizadas 64%, ratas em proestro 52%, em estro 59%, em metaestro 54% e em diestro 53% quando comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$; Figura 9).

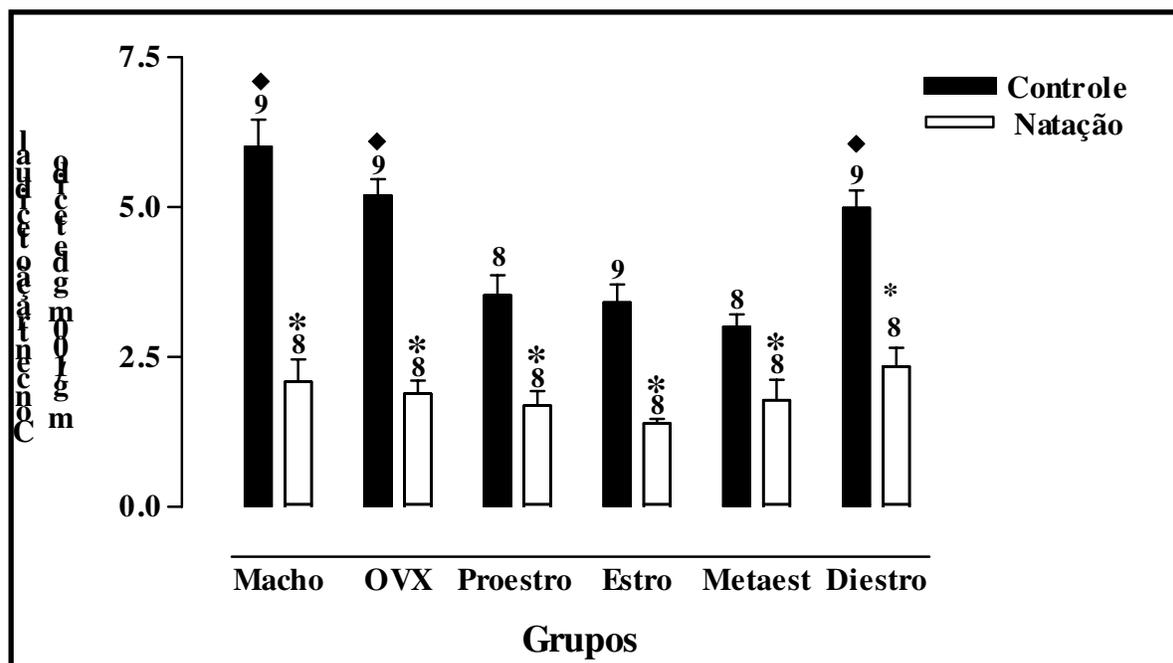


Figura 9. Concentração tecidual de glicogênio no fígado de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais de cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos grupos controle de fêmeas em proestro, estro e metaestro. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Na figura 10 observamos a concentração plasmática de glicose em animais controle e submetidos a estresse por natação. O grupo de ratas em metaestro controle apresentou maior glicemia basal em relação aos demais grupos controle. Ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e em proestro e em diestro submetidos a estresse apresentaram aumento da glicemia de 44%, 43%, 31% e 39% quando comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$; Figura 10). Porém a natação não alterou as concentrações plasmáticas de glicose em fêmeas em estro e em metaestro ($p < 0,05$; Figura 10).

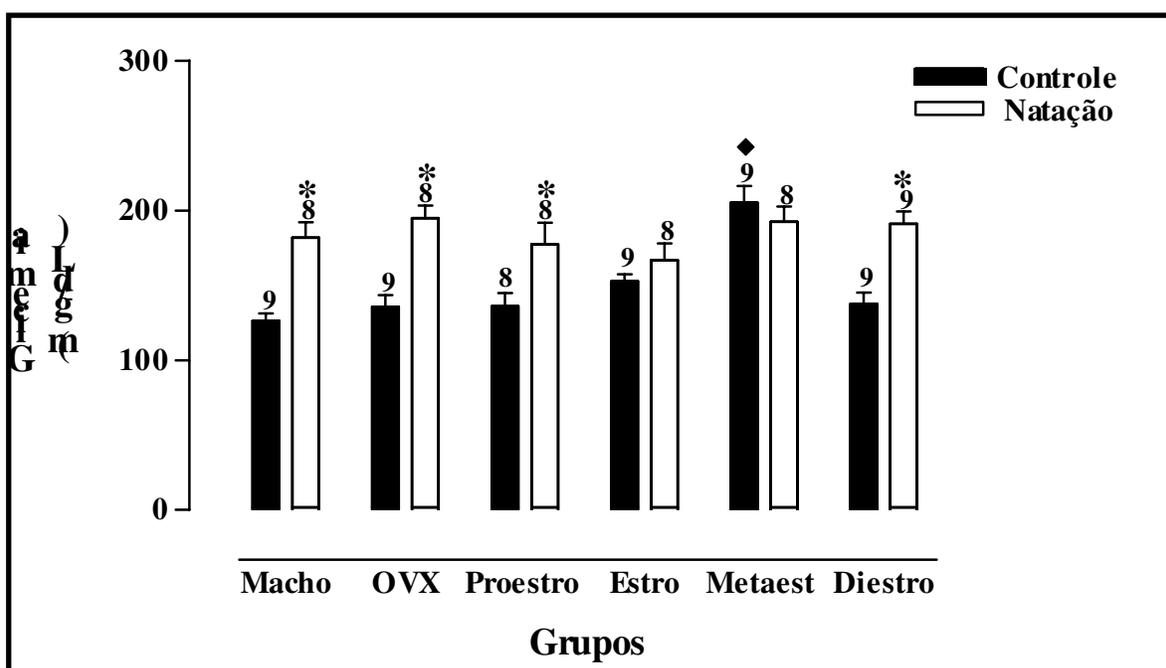


Figura 10. Concentração plasmática de glicose de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle * Diferença estatística em relação aos respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

A figura 11 ilustra as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em animais controles e submetidos ao estresse. Ratas controle em diestro apresentaram maiores níveis plasmáticos de triglicerídeos quando comparadas aos demais grupos controle ($p < 0,05$; Figura 11). Ratos machos, fêmeas ovariectomizadas, em proestro, estro e em metaestro submetidos à sessão de natação apresentaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos de triglicerídeos nas seguintes porcentagens: 44%, 77%, 57%, 38% e 73% comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$; Figura 11). Entretanto, ratas em diestro submetidas a estresse apresentaram diminuição (33%) deste parâmetro ($p < 0,05$; Figura 11).

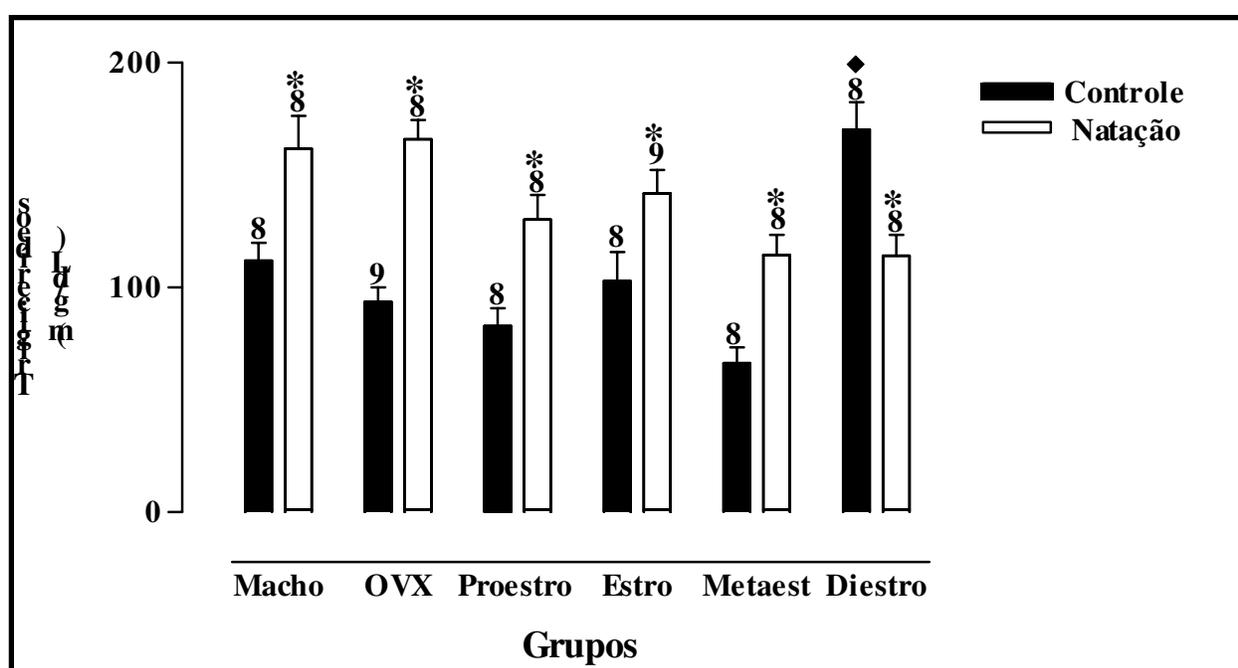


Figura 11. Concentração plasmática de triglicerídeos de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Com relação às avaliações hormonais, fêmeas em metaestro controle apresentaram concentrações plasmáticas mais elevadas de corticosterona em relação aos demais grupos controle ($p < 0,05$; Figura 12). O estresse por natação induziu elevação na concentração plasmática deste hormônio em ratos machos (110%) e fêmeas ovariectomizadas (286%) em proestro: 196%, estro: 540%, metaestro: 124% e diestro: 543% em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,05$; Figura 12). A elevação plasmática de corticosterona, induzida pelo estresse, em ratos machos foi menor do que aquela observada em fêmeas ($p < 0,05$; Figura 12).

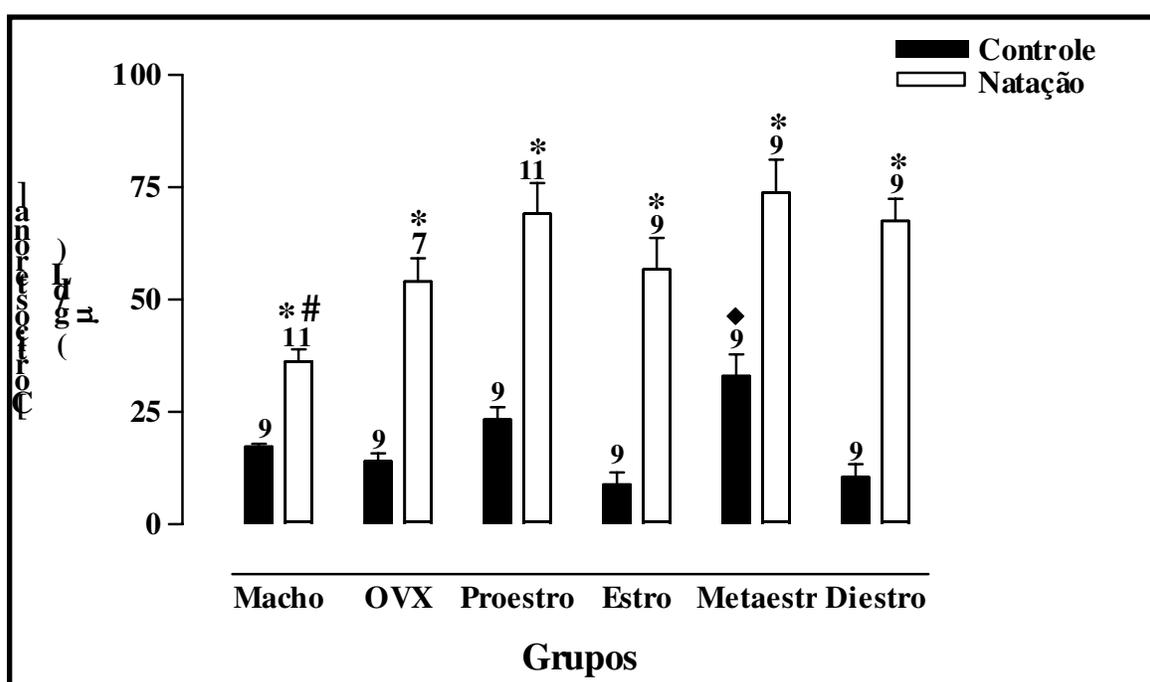


Figura 12. Concentração plasmática de corticosterona de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦Diferença estatística em relação aos grupos de fêmeas em estro e em diestro controle. # Diferença estatística em relação aos demais grupos submetidos ao estresse. * Diferença estatística em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

A concentração plasmática de estradiol e progesterona de machos e ratas castradas era inferior ao limite de sensibilidade da técnica, e desta forma, não foi possível mensurar estes valores.

O grupo de fêmeas em proestro controle apresentou maior concentração de estradiol em relação aos demais grupos controle ($p < 0,05$; Figura 13). O estresse por natação induziu aumento na concentração plasmática de estradiol em ratas nesta fase (89%) ($p < 0,05$), sem alteração nas demais fases do ciclo estral ($p > 0,05$; Figura 13).

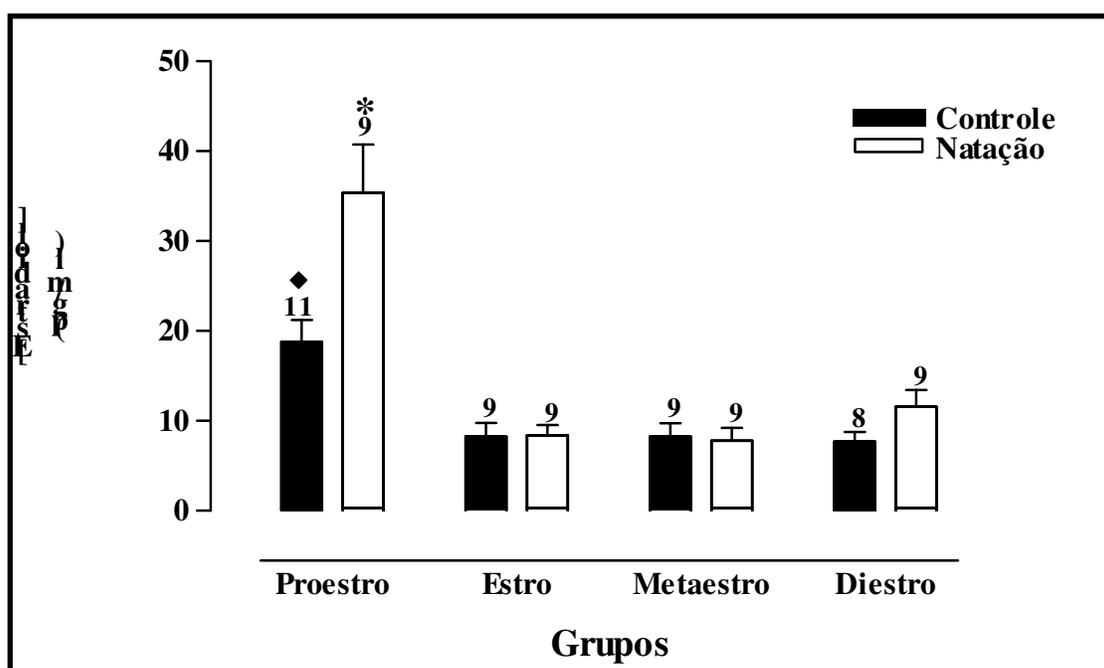


Figura 13. Concentração plasmática de estradiol de ratas controle e submetidas à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. * Diferença estatística em relação aos demais grupos controle e submetidos ao estresse ($p < 0,05$).

Na figura 14 apresentamos as concentrações plasmáticas de progesterona de fêmeas controle e submetidas à natação. Ratas em metaestro controle apresentaram maior concentração basal de progesterona comparadas às demais fases do ciclo estral ($p < 0,05$; Figura 14). Ratas em proestro submetidas à natação apresentaram aumento na concentração plasmática de progesterona (443%) em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Figura 14). Porém, na fase de metaestro, foi observada diminuição nas concentrações plasmáticas deste hormônio em ratas submetidas a estresse (63%) quando comparadas ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Figura 14), sem alterações no estro e diestro ($p > 0,05$; Figura 14).

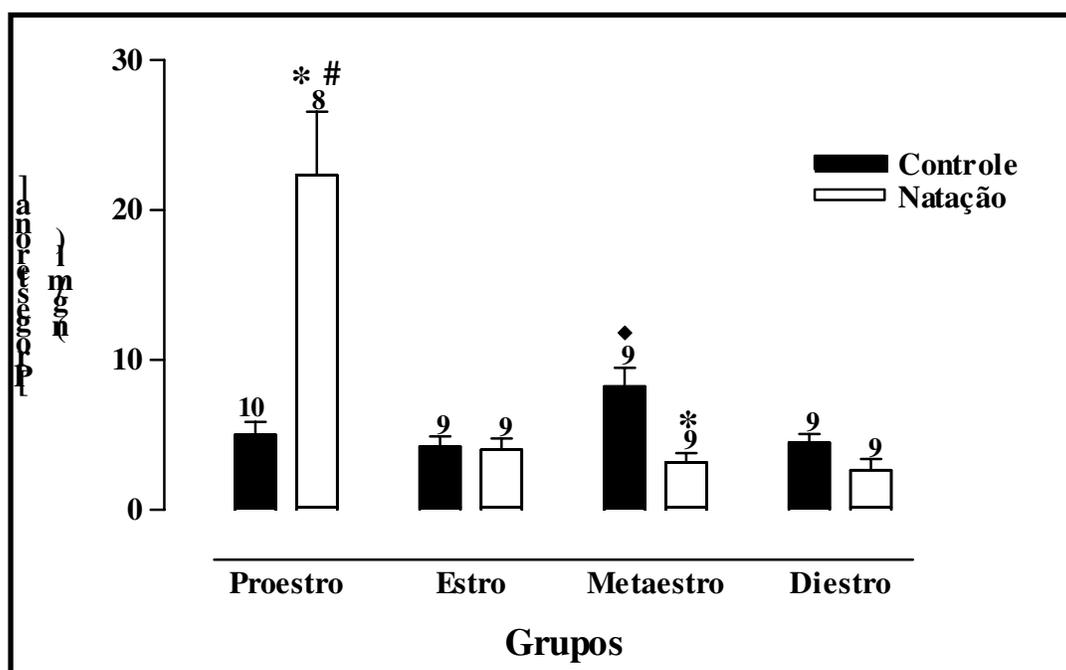


Figura 14. Concentração plasmática de progesterona de ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. # Diferença estatística em relação aos demais grupos submetidos ao estresse. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle. ($p < 0,05$).

Na figura 15 ilustramos a concentração tecidual de glicogênio do músculo cardíaco. O grupo de fêmeas controle em metaestro apresentou menor concentração de glicogênio neste músculo quando comparado aos demais grupos controle ($p < 0,05$; Figura 15). Ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e em proestro, estro e diestro submetidos à sessão de estresse apresentaram diminuição deste substrato nas seguintes porcentagens: 58%, 66%, 53%, 45%, e 43% quando comparados aos respectivos controle ($p < 0,05$; Figura 15). Porém, não houve alteração na concentração de glicogênio no músculo cardíaco de ratas em metaestro submetidas à natação comparadas ao respectivo controle ($p > 0,05$; Figura 15).

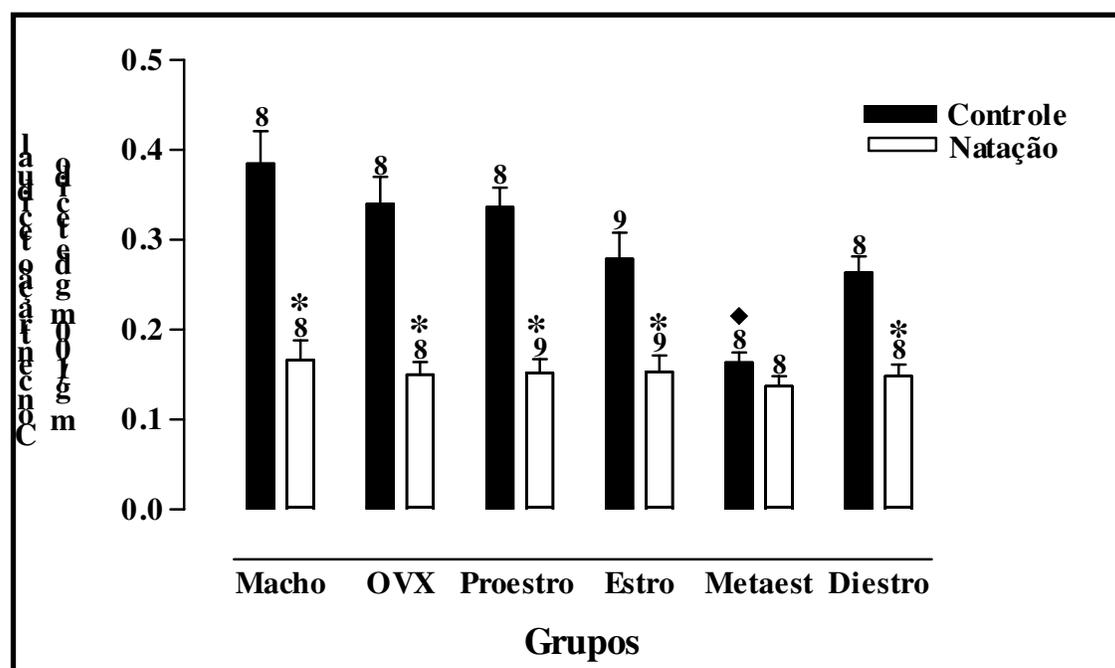


Figura 15. Concentração tecidual de glicogênio no músculo cardíaco de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais de cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Ratos machos controle e fêmeas ovariectomizadas apresentaram maiores níveis basais de glicogênio no músculo sóleo quando comparados a ratas em proestro, metaestro e diestro controle (Figura 16). No grupo de fêmeas controle em proestro foi observada menor concentração de glicogênio em relação a fêmeas controle na fase de estro, ovariectomizadas e machos. A natação induziu uma diminuição da concentração de glicogênio no músculo sóleo somente em ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e em estro com as seguintes porcentagens de decréscimo: 70%, 52% e 46% ($p < 0,05$, Figura 16).

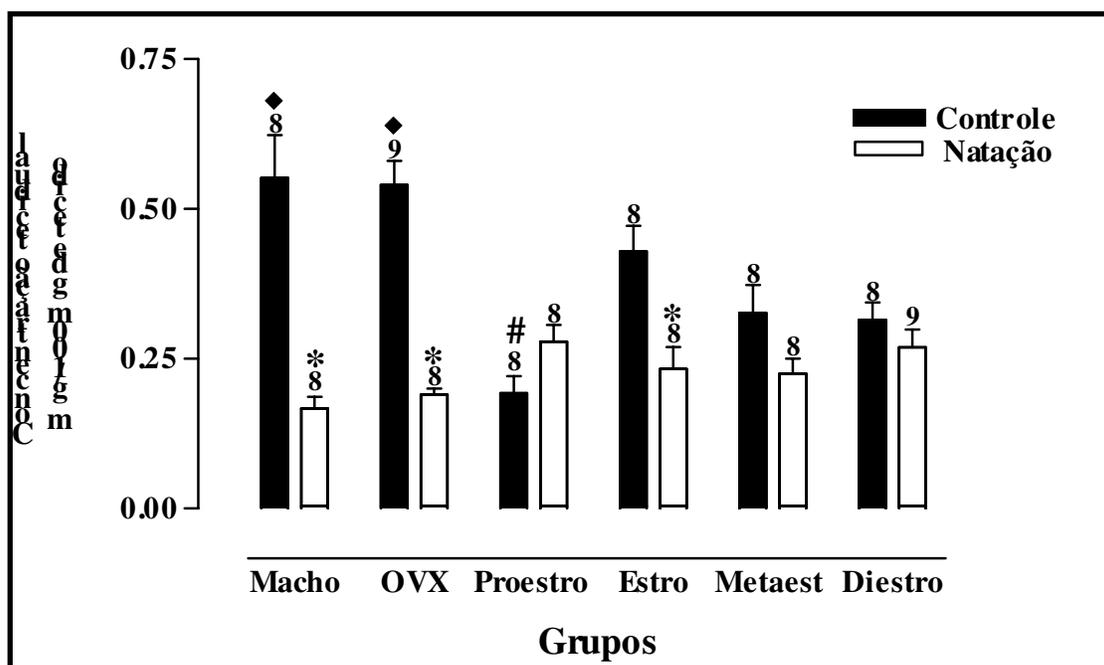


Figura 16. Concentração tecidual de glicogênio no músculo sóleo de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais de cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação ao grupo controle de ratas em proestro, metaestro e diestro. # Diferença estatística em relação ao grupo controle de fêmeas em estro. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

Com relação à concentração tecidual de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho, ratos machos e fêmeas ovariectomizadas controle apresentaram maiores concentrações em relação a fêmeas controle nas quatro fases do ciclo estral ($p < 0,05$; Figura 17). Houve diminuição dos níveis de glicogênio neste músculo em todos os grupos submetidos à natação quando comparados aos respectivos grupos controle nas seguintes porcentagens respectivamente: 77% - machos, 52% - ovariectomizadas, 57%- proestro, 55% - estro, 58% - metaestro e 54% - diestro .

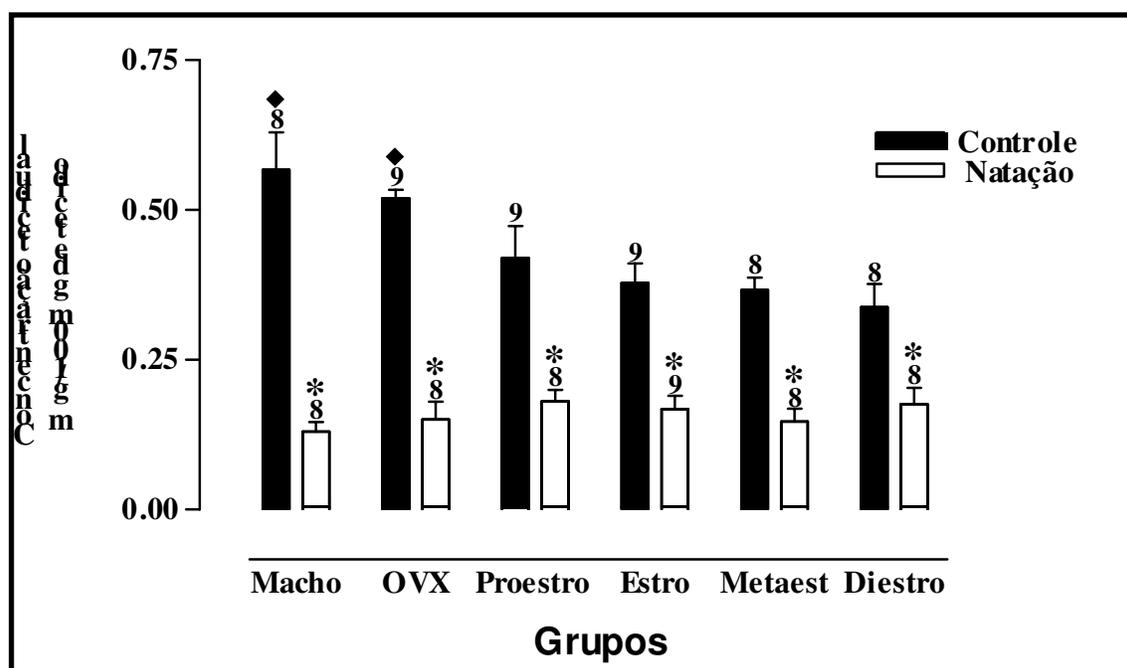


Figura 17. Concentração tecidual de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle. * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

A figura 18 ilustra os valores de glicogênio tecidual no músculo gastrocnêmio branco. Semelhante ao ocorrido com o músculo gastrocnêmio vermelho, os grupos machos de fêmeas ovariectomizadas controle apresentaram maiores níveis de glicogênio muscular em relação a fêmeas controle. Em ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e em proestro, estro e diestro, a natação induziu diminuição significativa na concentração de glicogênio nas seguintes porcentagens: 61%, 73%, 38%, 36% e 45% em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,05$; Figura 18). Porém não houve alteração em fêmeas submetidas à natação na fase de metaestro ($p > 0,05$; Figura 18).

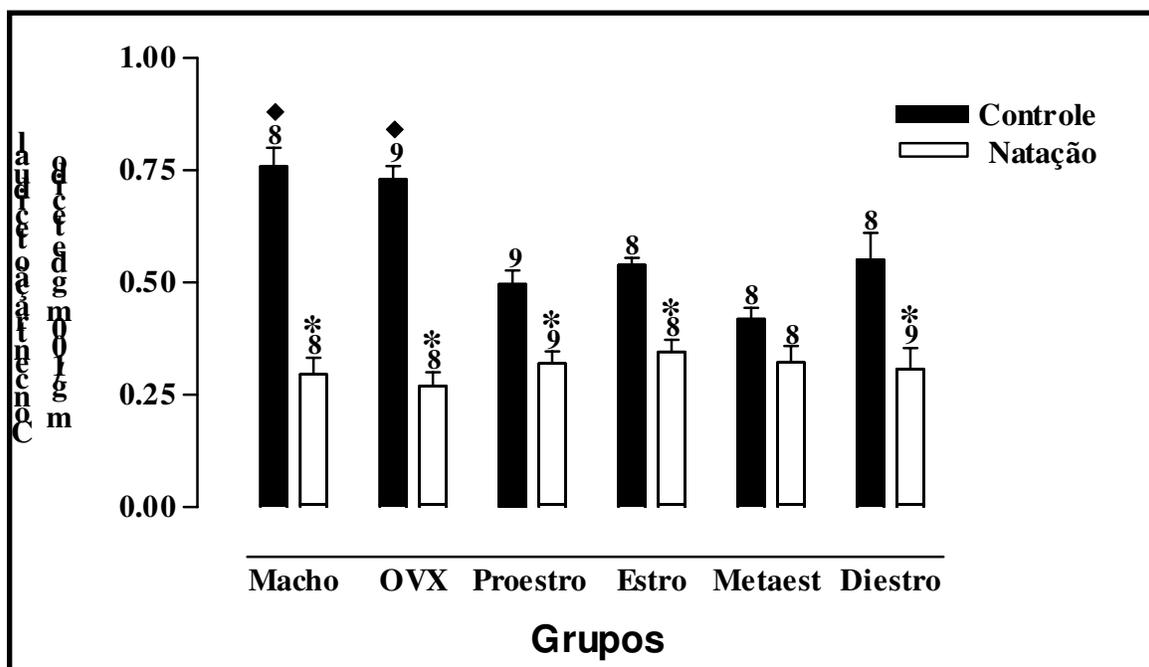


Figura 18. Concentração tecidual de glicogênio no músculo gastrocnêmio branco de ratos e ratas controle e submetidos à natação. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. ♦ Diferença estatística em relação aos demais grupos controle * Diferença estatística em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$). OVX= ratas ovariectomizadas.

7. DISCUSSÃO

Sabe-se que o aumento de corticosterona ocorre em resposta ao estresse e ao exercício físico (Axelrod & Reisini, 1984; Koob, 1999). Observamos que os grupos submetidos à natação apresentaram elevação das concentrações plasmáticas de corticosterona, validando o modelo de estresse por nós utilizado. O aumento foi menor em machos. Muitos trabalhos relatam as diferenças entre machos e fêmeas na liberação de corticosterona. Esta diferença pode estar relacionada com as múltiplas ações exercidas pelos andrógenos e estrógenos em diferentes níveis do eixo HHA (Le Mével *et al.*, 1982; Dupouy *et al.*, 1987; River, 1999), podendo haver uma maior ou menor inibição do mesmo (Shors *et al.*, 1999)

A corticosterona juntamente com as catecolaminas, liberadas durante a reação de estresse, estimulam a glicogenólise e a neoglicogênese hepáticas (Exton, 1972; Lavoie, 2002), resultando em elevação da glicemia (Lehninger *et al.*, 2002). Isto indica que provavelmente a elevação deste parâmetro observada em ratos machos, fêmeas ovariectomizadas, em proestro e em diestro submetidos a estresse, poderia estar relacionada com as ações destes hormônios, o que aumentaria o processo de glicogenólise hepática, liberando a glicose para a corrente sanguínea e favorecendo a catação por outras células (Lehninger *et al.*, 2002; Lavoie, 2002; Verago, 2000). Em nossos resultados, a análise da mobilização de glicogênio hepático, durante a natação, evidencia que a diminuição do glicogênio hepático ocorrida em machos e ratas ovariectomizadas, em proestro e em diestro estaria relacionada à manutenção da concentração plasmática de glicose, evitando o comprometimento de atividades vitais (Pacak & McCarty, 2000).

Porém, em ratas nas fases do estro e do metaestro, este aumento de glicemia não foi evidenciado, mesmo havendo a mobilização de glicogênio hepático. Fêmeas em metaestro controle apresentaram glicemia e concentrações de corticosterona e progesterona mais elevadas em relação às outras fases do ciclo estral. As concentrações de corticosterona aumentadas no controle poderiam explicar as maiores taxas glicêmicas, como vimos anteriormente (Exton, 1972; Lavoie, 2002). Há estudos na literatura relacionando o papel dos hormônios sexuais na regulação da glicogenólise. Sancho *et al.* (1988) relataram que a progesterona ativa a enzima glicogênio fosforilase hepática, responsável pela quebra deste

polissacarídeo de reserva, tendo um efeito glucagon-símile. Desta forma, há uma maior formação de glicose, que pode ser liberada na corrente sanguínea, elevando a glicemia (Lehninger *et al.*, 2002). Nossos dados, com relação à concentração de progesterona, evidenciam uma elevação na fase do metaestro que poderia estar aumentando a atividade da enzima glicogênio fosforilase hepática, aumentando a glicemia (Sancho *et al.*, 1988; Lehninger *et al.*, 2002).

Outras alterações causadas pelos hormônios sexuais poderiam também estar participando destes achados, como por exemplo, a captação de glicose pelos tecidos, causada pela externalização dos transportadores de glicose. Para ser captada pelos músculos, em situações de repouso, a glicose necessita da ação da insulina, que atuará em receptores do tipo tirosina quinase, ativando o processo de externalização dos transportadores GLUT (Grimm, 1999; Niklasson, 2000). Estes facilitam o processo de transporte da glicose para o interior das células, não elevando a glicemia mesmo que a glicogenólise hepática esteja atuando. Kumagai *et al.* (1993) demonstraram o papel da progesterona e do estradiol na sensibilidade dos tecidos à insulina, concluindo que a progesterona parece causar um quadro de resistência à insulina. Grimm (1999) descreveu este quadro, no qual há diminuição dos transportadores GLUT, diminuindo a captação de glicose pelo músculo esquelético durante o repouso, havendo aumento nas concentrações plasmáticas da mesma. Isto poderia explicar as possíveis causas da glicemia aumentada em ratas em metaestro controle, as quais apresentam concentração plasmática de progesterona mais elevada.

Ratas em metaestro e em estro submetidas à natação não apresentaram elevação da glicemia em relação aos seus respectivos controles. Após a sessão de estresse por natação, as concentrações plasmáticas de progesterona diminuíram no metaestro sem alteração no estro. A queda nas concentrações deste hormônio, em ratas no metaestro, poderia estar relacionado a uma maior captação da glicose pelos músculos, através da ativação dos transportadores GLUT (Kumagai, 1993). Outra explicação poderia ser a maior atividade da enzima hexoquinase, pois a progesterona em níveis baixos aumenta sua atuação. Esta enzima fosforila a glicose captada, impedindo que a mesma seja removida do interior da fibra muscular (Lehninger *et al.*, 2002), não elevando a glicemia, mesmo em animais

submetidos ao estresse. Ratas em estro, mesmo apresentando corticosterona mais elevada e quebra do glicogênio hepático, não apresentou elevação da glicemia, que poderia estar associado a uma maior utilização deste substrato por outros órgãos (Ivy *et al.*, 1981; Lehninger *et al.*, 2002).

O fígado é considerado o principal tecido responsável pela captação de glicerol plasmático (Lin, 1977), que pode ser utilizado como um dos substratos para a gliconeogênese mas também para a síntese de triglicerídeos (Souza *et al.*, 1996). Em situações em que ocorre elevação da concentração plasmática das catecolaminas e dos glicocorticóides, espera-se um *turnover* maior ou menor dos elementos lipídicos do metabolismo (Verago, 2000), que pode ser acompanhado ou não da elevação de suas concentrações plasmáticas. Em ratas em diestro, poderia estar ocorrendo uma captação muscular aumentada, ocasionando valores menores que o controle.

Vários estudos clínicos e experimentais sugerem o envolvimento de hormônios esteróides sexuais no controle do metabolismo e na distribuição regional do tecido adiposo, além de demonstrarem a presença de receptores para esteróides sexuais em adipócitos (Gray *et al.*, 1985; Rebuffe-Scrive, 1987; Pedersen *et al.*, 1996). Além da influência do sexo, foi também descrita a influência do ciclo estral sobre a tecido adiposo. A atividade da enzima lipase lipoproteica é maior na fase do diestro comparada às demais fases do ciclo estral. Este grupo de enzimas atua na degradação dos triglicerídeos armazenados no tecido adiposo, aumentando a concentração de ácidos graxos, diacilgliceróis e triglicerídeos plasmáticos (Yamaguchi *et al.*, 2002), podendo explicar os níveis mais elevados deste parâmetro em ratas em diestro controle. A queda dos níveis de triglicerídeos nestas ratas, após o estresse, poderia estar associado a sua maior captação por outros tecidos, em especial os músculos esqueléticos, para produção de energia (Lehninger *et al.*, 2002).

O aumento de triglicerídeos plasmáticos que foi observado em ratos machos, fêmeas ovariectomizadas e em proestro, estro e em metaestro poderia estar associado à estimulação da atividade lipolítica, devido à ação do glucagon e das catecolaminas liberados durante a reação de estresse (Farias-Silva, 1999), liberando ácidos graxos, glicerol e triglicerídeos para o sangue (Slavin *et al.*, 1994; Lafontan *et al.*, 1995).

Analizamos também a mobilização de glicogênio muscular. Este carboidrato de reserva, quando quebrado, é utilizado para a atividade contrátil do próprio músculo no momento do exercício (Blawacka *et al.*, 1978; Mcardle *et al.*, 1998; Radziuk, 2001). Na fibra muscular, não ocorre a desfosforilação da glicose-6-fosfato formada pela glicogenólise (Lehninger *et al.*, 2002), não havendo participação direta do glicogênio muscular na manutenção da glicemia. Desta forma, a mobilização deste substrato energético permite verificar quais músculos são ativados durante o protocolo de estresse agudo por natação.

Com relação à concentração de glicogênio no músculo cardíaco, fêmeas em metaestro controle apresentaram menor concentração comparado em relação aos demais grupos. Isto poderia estar relacionado às altas concentrações plasmáticas de progesterona observado nesta fase do ciclo estral. Isto, como vimos anteriormente, poderia estar inibindo a atividade da enzima hexoquinase, impedindo que a glicose, ao ser captada, fosse fosforilada, impossibilitando a sua permanência e utilização pelo músculo (Grimm *et al.*, 1999), ocasionando uma maior mobilização de suas próprias reservas. Ratas nesta mesma fase, quando submetidas à natação, não apresentaram diminuição de glicogênio neste músculo. O músculo cardíaco, na maior parte das vezes, utiliza ácido graxo para produção de energia (Moreau *et al.*, 1978). Assim, os carboidratos poderiam não estar sendo utilizados por ratas nesta fase. Este fato poderia também estar associado aos níveis teciduais deste polissacarídeo mais baixos comparados aos outros grupos, o que seria um mecanismo de proteção do organismo evitando a queda do glicogênio a concentrações muito reduzidas (Blawacka *et al.*, 1977), que comprometeriam a atividade contrátil espontânea do coração (Guyton, 1995). Ratos machos, ratas ovariectomizadas, em proestro, estro e diestro, provavelmente utilizaram tanto ácidos graxos, como o glicogênio tecidual. Estes grupos controle apresentaram uma concentração mais elevada de polissacarídeo em relação a fêmeas em metaestro, e sua utilização durante a sessão de estresse por natação, não comprometeria a atividade contrátil cardíaca.

A resposta fisiológica ao exercício acarreta em aumento da frequência cardíaca, pressão sanguínea e aumento do fluxo de sangue para os músculos, e parte destas são ocasionadas pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático (Rowel *et al.*, 1990). Mudanças no

metabolismo muscular resultam em estimulação de fibras aferentes sensitivas a metabólitos localizadas no interstício da fibra muscular (Kaufman *et al.*, 1984). Quando ativadas, estas fibras causam um reflexo pressórico aumentando a ação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático causando uma vasodilatação nos músculos ativos (Mark *et al.*, 1955). Os hormônios ovarianos podem causar alterações neste metabolismo e altero aporte sanguíneo aos músculos (Jurkowski *et al.*, 1981).

Ratas em proestro controle apresentaram menor concentração de glicogênio no músculo sóleo quando comparadas a ratas ovariectomizadas, em estro e em machos. Isto poderia estar relacionado com as maiores concentrações plasmáticas de estradiol, que poderiam estar causando um aumento da glicogenólise (Ashley, 1995). E como mostram nossos resultados. E a não utilização de glicogênio em ratas na fase do proestro submetidas à natação estaria relacionado ao mecanismo de proteção do organismo, como vimos anteriormente, para que este estoque não diminuísse excessivamente (Blawacka *et al.*, 1977). Outra hipótese seria a realização de um metabolismo anaeróbio, formando maior concentração de ácido láctico e outros metabólitos. Estes ativariam fibras nociceptivas do tipo C, altamente discriminativas e lentas, provocando a sensação de queimadura no local, impossibilitando a ativação do músculo (Ghorayeb & Barros, 1999).

No músculo sóleo observamos que ocorreu a ativação da glicogenólise nos grupos de ratos machos e ratas ovariectomizadas e em estro submetidos à natação. Este músculo apresenta a maior parte constituída pelas fibras vermelhas e como características destas observa-se a contração lenta (Mcardle *et al.*, 1998), alta capacidade oxidativa e abundante irrigação sanguínea. Estas fibras são solicitadas em exercícios de baixa intensidade e o metabolismo energético predominante é o aeróbico (Ghorayeb & Barros, 1999). Durante a natação ocorrem ajustes circulatórios nos músculos pela vasodilatação (Andersen & Saltin, 1985; Langberg *et al.*, 2002). Ratas em metaestro e em diestro poderiam ter tido este ajuste circulatório mais acelerado no músculo sóleo, permitindo uma maior utilização de substratos provenientes da corrente sanguínea como glicose, ácidos graxos e triglicerídeos, porém seriam necessários mais estudos sobre o fluxo sanguíneo neste músculo para estabelecermos se ocorreu maior vasodilatação (Jurkowski *et al.*, 1981). Estes dados, associados ao fato de que ratas na fase de metaestro submetidas à natação não apresentaram

elevação da glicemia, podem indicar que houve um maior fluxo sanguíneo e desta forma, captação pelos músculos de outros substratos e de glicose, não havendo necessidade do músculo quebrar suas reservas estocadas, pois teria substratos suficientes provenientes da circulação (Langberg *et al.*, 2002).

Com relação ao músculo gastrocnêmio vermelho, houve mobilização das reservas energéticas em todos os grupos submetidos à natação. Este resultado permite estabelecer a participação deste músculo durante a natação, pois houve a ativação da glicogenólise pelo exercício físico. A natação induziu uma diminuição nos níveis de glicogênio do músculo gastrocnêmio branco com exceção de ratas em metaestro. As fibras musculares presentes neste músculo são predominantemente do tipo branca, apresentando alta velocidade de contração e estão envolvidas em atividades de alta intensidade e de curta duração (Saltin *et al.*, 1977). Apresentam alta capacidade de quebra do glicogênio tecidual para sua própria utilização (Ghorayeb & Barros, 1999).

Entretanto, analisamos apenas a concentração tecidual do glicogênio, seria necessária a realização de experimentos envolvendo enzimas que participam nos processos de síntese e degradação deste polissacarídeo nos músculos para termos dados conclusivos da influência do sexo, do ciclo estral e do estresse agudo no metabolismo destes animais.

Os esteróides sexuais também poderiam estar envolvidos em outros aspectos além dos metabólicos descritos, tendo em vista que a secreção de progesterona e estradiol podem ser alteradas por estímulos estressores, conforme nossos resultados e outros autores demonstraram (Plas-Roser & Aron, 1977; Boehm *et al.*, 1982; Bruce *et al.*, 1984; MacNiven, 1992; Marcondes, 1998; Shors *et al.*, 1999). A exposição a eventos estressores pode aumentar ou reduzir os níveis de estrógeno em ratas, dependendo do tipo e da duração da experiência estressante, quando animais foram submetidos à natação ocorreu aumento nos níveis séricos de estradiol (Shors *et al.*, 1999), enquanto o estresse crônico por imobilização em ratas promoveu diminuição (Shors *et al.*, 1999).

Estes dados com relação às alterações metabólicas e hormonais podem auxiliar na compreensão das respostas comportamentais por nós descritas anteriormente, no mesmo modelo experimental (natação). Ao ser colocado na água pela primeira vez, o rato

rapidamente passa a nadar em torno das bordas do tanque, aparentemente procurando escapar (Bianchi *et al.*, 2001). Depois de alguns segundos seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, alternando a natação com momentos de imobilidade (Bianchi *et al.*, 2001; 2002). Como a movimentação do animal na água parece estar negativamente correlacionada às chances de sobrevivência do animal, a diminuição da atividade representa uma resposta adaptativa (Bruner & Vargas, 1994; Bianchi *et al.*, 2001; 2002). Analisando o tempo de imobilidade de ratos submetidos a uma sessão de natação observamos que, durante o proestro e o metaestro, o tempo total de imobilidade foi menor em relação a ratas ovariectomizadas e nas fases do estro e diestro e em machos. Estes animais apresentaram uma adaptação (desenvolveram mais rapidamente o ato de boiar) mais rápida, o que poderia estar relacionada com as baixas concentrações dos hormônios ovarianos.

O sexo e o ciclo estral influenciaram a mobilização das reservas de energia, secreção de hormônios ovarianos e corticosterona e o comportamento de animais submetidos ao estresse agudo por natação.

8. CONCLUSÕES

- Em ratos não estressados, o sexo, ciclo estral e ovariectomia influenciaram: o armazenamento de glicogênio, as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e glicose e a concentração basal de corticosterona.
- Em ratos submetidos a estresse agudo por natação, o sexo, ciclo estral, ovariectomia influenciaram: a mobilização das reservas de glicogênio tecidual, a liberação de triglicerídeos e glicose e a secreção de corticosterona, de estradiol e progesterona.
- Em ratos, os efeitos do sexo e do ciclo estral sobre as respostas metabólicas ao estresse agudo por natação, parecem estar relacionadas as diferenças na secreção de corticosterona, estradiol e progesterona.

REFERÊNCIAS²

- Adler BA, Johnson MD, Lynch CO, Crowley WR. Evidence that norepinephrine and epinephrine systems mediate the stimulatory effects of ovarian hormones on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone. **Endocrinology**. 1983; 113(4): 1431-8.
- Andersen P, Saltin B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. **J. Physiol**. 1985; 366: 233-49.
- Anderson SM, Saviolakis GA, Bauman RA, Chu KY, Ghosh S, Kant GJ. Effects of Chronic Stress on Food Acquisition, Plasma Hormones, and the Estrous Cycle of Female Rats. **Physiol Behav**. 1996; 60(1): 325-9.
- Anishchenko TG, Gudkova EV. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenalin. **Byull. Éksp. Biol. Med.** 1992; 113(6): 577-579.
- Ashley CD, Kramer ML, Bishop P. Estrogen and substrate metabolism: a review of contradictory research. **Sports Med**. 2000; 29(4): 221-7.
- Axelrod J, Reisine TD. Stress Hormones: Their interaction and regulation. **Science**. 1984; 224(4648): 452-9.
- Avistur R, Donchin O, Barak O, Cohen E, Yirmiya R. Behavioral effects of interleukine-1 beta: modulation by gender, estrus cycle, and progesterone. **Brain Behav. Immunol**. 1995; 9: 234-241.
- Baron S, Brush R. Effects of acute and chronic restraint and oestrus cycle on pituitary-adrenal function in the rat. **Horm Behav**. 1979, 12(3): 218-224.
- Beckett T, Tchernof A, Toth M.J. Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. **Metabolism**. 2002; 51(11): 1397- 401.
- Bianchi FJ, Iwamoto M, Moura MJCS, Marcondes FK. Influence of water temperature on the behavior of rats submitted to swimming stress. IV World Congress on Stress, Edimburgo, Escócia. **Annals**, 2002, p. 64.
- Bianchi FJ, Tanno AP, Marcondes FK. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à noradrenalina em ratas no proestro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2001; 37(3): 391-8.
- Blawacka M., Roth Z., Wojcichowska F, Karon H. Effect of the exercise on glycogen level in muscles and liver in rats. **Acta Physiol. Pol**. 1977; 431-440.

² De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseada no modelo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Blawacka M, Karon H, Roth Z. Glycogen resynthesis in the rat muscle and liver after physical exercise. **Acta Physiol. Pol.** 1978; 29(6): 521-30.
- Boehm N, Plas-Roser S, Aron C. How different procedures of blood removal affect blood progesterone concentration in the cyclic female rats. **Steroid. Biochem.** 1982; 16: 339-42.
- Borba-Murad GR, De Souza HM, Lopes G, Ferreira EB, Dambroso RB. Changes in glycemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 1998; 102(2): 113-23.
- Brau L, Ferreira LD, Nikolovski S, Raja G, Palmer, TN, Fournier P. Regulation of glycogen synthase and phosphorylase during from high-intensity exercise in rat. **Biochem J.** 1997; 15:303-8.
- Brindley DN, Akester H, Derrick GP, Irvine CD, Patmore, RD, Spencer H, Yule-Smith A, Saxton K, MacDonald IA, Rolland Y. Effects of chronic administration of benfluores to rats on the metabolism of corticosterone, glucose, triacylglycerols, glycerol and fatty acid. **Biochem. Pharmacol.** 1988; 37(4): 695-705.
- Briner RB. Improving stress assessment: toward an evidence-based approach to organizational stress interventions. **J Psychosom Res.** 1997; 43(1): 61-71.
- Bruce NW, Willcox DL, Meyer GT, Waddel BJ. Effects of handling, anesthesia, ovariectomy, and adrenalectomy on serial measurements of plasma progesterone in 16-day pregnant rats. **J. Endocr.** 1984; 100: 189-93.
- Bruner CA, Vargas I. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. **Physiol. Behav.** 1994; 55: 21-28.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology.** 1974; 194(6): 1704-8.
- Caldeira JC. Neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo e respostas a diferentes condições de estresse. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 2001, 102 p.
- Campbell SE, Febbrario MA. Effect of the ovarian hormones on GLUT4 expression and contraction-stimulated glucose uptake. **Endocrinol. Metab.** 2002; 282(54): 1139-46.

- Chang H, Chen SS, Tsao DA, Cheng JT, Ho CK, Yu HS. Change of cardiac β -adrenoceptors in lead-exposed rats. **Toxicology**. 1997; 123(1-2): 27-32.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**. 1992; 267(9): 1244-52.
- Ciocca DR, Roig LMV. Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. **Endoc. Rev.** 1995; 16(1): 35-62.
- Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**. 1995; 62: 295-301.
- Cox RH, Hubbard JW, Lawlwer JE, Sanders BJ, Mitchell VP. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. **J. Appl. Physiol.** 1985; 58 (4): 1207-14.
- Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. **J Biol Chem** 1980; 255:4758-62.
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioral and physiological responses to the stressor. **Behav Brain Res**. 2000; 114(1-2), 175-81.
- Domingos EF, Tambeli CH, Marcondes FK. Avaliação da relação entre dor na região orofacial e ansiedade em um modelo animal. **17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Águas de Lindóia – SP. Pesquisa Odontológica Brasileira, 14 (suppl.): 31; 2000.**
- Drickamer LC. Determination of oestrous condition in female mice is dependent upon time of day. **J Reprod Fertil**. 1987; 79(2): 659-62.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. 1977; 4: 161-174.
- Dupouy JP, Hary L, Lalau JD, Grégoire I, Chatelain A. Influence périnatale des hormones sexuelles sur l'activation différentielle de la fonction corticotrope au cours du stress chez le mâle et la femelle. **Ann. Endocrinol.** 1987; 48: 385-92.
- Eliot RS. Fisiologia do estresse. *In: Estresse e o coração – mecanismo, avaliação e cuidados.* Rio de Janeiro: Revinter. 2002.

- Exton JH, Friedmann N, Hee-Aik Hong E, Brineaux P, Corbin JD, Park CR. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine at the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipocyte tissue. **The J. Biol. Chem.** 1972; 247(11): 3579-88.
- Fain JN, Garcia-Sáinz JA. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. **J. Lipid Res.** 1983; 24: 945-66.
- Farias-Silva E, Grassi-Kassisse DM, Wolf-Nunes V, Spadari-Bratfisch RC. Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. **J. Lipid. Res.** 1999; 40 (9): 1719-27.
- Felig P, Wahren J, Hendler R, Ahlborg G. Plasma glucagon levels in exercising man. **N. Engl. J. Med.** 1972; 287:184.
- Flügge G. Alterations in the central nervous α_2 -adrenoceptor system under chronic psychosocial stress. **Neuroscience**, 1996; 75(1): 187-96.
- Fraser D, Ritchie JSD, Fraser AF. The term “stress” in a veterinary context. **Br Vet J.** 1975; 131(6): 653-62.
- Freeman ME. **The ovarian cycle of the rat.** In: Knobil, E. et al. The physiology of reproduction. New York: Raven Press. LTD, 1988.
- Friedman MI, Tordoff MG, Ramirez I. Integrated metabolic control of food intake. **Brain Res. Bull.** 1986; 17:855-9.
- Frier BM. Hypoglycemia. In: Fink G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v. 2, 2000.
- Garcia-Marquez C, Armario A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. **Physiol. Behav.** 1987; 40: 33-8.
- Gardemann A, Jahns U, Jungermann K. Control of glucogenolysis and blood flow by arterial and portal norepinephrine in perfused liver. **Am. J. Physiol.** 1991; 260(5/1): E762-71.
- Ghorayeb N, Barros T. **O exercício: Preparação Fisiológica, Avaliação médica, Aspectos especiais e preventivos.** São Paulo, Ed. Atheneu, 1999, 496p.
- Gray JM, Dudley SD, Wade, GN. In vivo cell nuclear binding of 17β estradiol in rat adipose tissues. **Am. Physiol. Society.** 1985; e43-6.

- Griffin JFT. Stress and immunity: a unifying concept. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 1989; 20: 263-312.
- Grimm JJ. Interaction of physical activity and diet: implications for insulin-glucose dynamics. **Public Health Nutrition.** 1999; 363-8.
- Guyton AC. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças.** 5. ed.. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1995, 575p.
- Hackney AC. Influence of oestrogen on muscle glycogen utilization during exercise. **Acta Physiol. Scand.** 1999; 167(3): 273-4.
- Haller J, Fuchs E, Halasz J, Makara GB. Defeat is a major stressor in male while social instability is stressful mainly in female: Towards the development of a social stress model in female rats. **Brain Res Bull.** 1999; 50(1): 33-9.
- Handa R J, McGiven RF. Gender and Stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v. 2, 2000.
- Hansen PA, Gulve E, Gao J, Schuler J, Mueckler M., Holloszy, JO. Kinetic 2-deoxyglucose transport in skeletal muscle: Effects of insulin and contradictions. **Am. J. Physiol.** 1995; 268:c30-5.
- Hashimoto I., Hendricks D M, Anderson LL, Melampy RM. Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. **Endocrinology.** 1968; 82(2): 333-41.
- Herd JA. Cardiovascular response to stress. **Physiol. Rev.** 1991; 71(1): 305-30.
- Hoar WS. **General and Comparative Physiology.** 2 ed. Prentice-Hall International, ed. New Jersey EUA, 1975.
- Holega C, Zaagsma J. Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptors in rat adipocytes. **Br J Pharmacol.** 1989; 6(2-3): 325-30.
- Horowitz J.F, Klein S. Lipid metabolism during endurance exercise. **Am J Clin Nutr.** 2000; 72(2): 568-73.
- Houssay AC. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças.** 5. ed.. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1995, 575p.
- Ivy JL., Hollosky, JO. Persistent increase in glucose uptake by rat skeletal muscle following exercise. **Am. J. Physiol.** 1981; c200-3.

- Jurkowski JE, Jones, NL, Toews, CJ, Sutton, JR. Effects of menstrual cycle on blood lactate, O₂ delivery and performance during exercise. **J. Appl. Physiol.** 1981; 54:1493-9.
- Kaufman MP, Rybuicki TG, Waldrop TG, Ordway, GA. Effect of ischemia on responses of group III and IV afferents to contraction. **J. Appl. Physiol.** 1984; 57: 644-50.
- Kendrick ZV, Ellis GS. Effect of estradiol on tissue glycogen metabolism and lipid availability in exercised male rats. **J. Appl. Physiol.** 1991; 71(5): 1694-9.
- Kitay JI. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. **Endocrinology.** 1961; 68(5): 818-24.
- Koob GF. Corticotrophin-releasing factor, norepinephrine and stress. **Biol. Psychiatry.** 1999; 46(9): 1167-80.
- Knox AM, Surton RG, Cooling J, Brindley, DN. Control of hepatic triacylglycerol synthesis. Diurnal variations in hepatic phosphatidate phosphohidrolase activity and in the concentrations of circulating insulin and corticosterone in rats. **Biochem. J.** 1979; 180(2): 441-3.
- Koolhaas JM, Korte, SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, De Jong IC, Ruis MA, Blokhuis HJ. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1999 23(7): 925-935.
- Kopin IJ. Catecholamine Metabolism: Basic Aspects and Clinical Significance. **Pharmacol Rev.** 1985; 37(4); 333-64.
- Krieger JE, Liard JF, Cowley W. Hemodynamics fluids volume, and hormonal responses to chronic high-salt intake in dogs. **Am. J. Physiol.** 1990; H1629-36.
- Kumagay S, Holmang A, Bjorntorp P. The effects of estrogen and progesteron on insulin sensitivity in female rats. **Acta Physiol. Scand.**, 149(1): 91-97, 1993.
- Kvetňansky R, McCarty R. Immobilization Stress. *In*: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v. 2, 2000.
- Lafontan M, Bousquet-Melou A, Galitziky J, Barbe P, Carpéné C, Langin D, Berlan M, Valet P, Bouloumé A, Saulnier-Blache JS. Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. **Obes. Res.** 1995; 3(suppl. 4): 507-14.

- Langberg H, Bjorn C, Boushel R, Hellsten Y, Kjaer M. Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. **J. Physiol.** 2002; 542(3): 977-83.
- Lavoie JM. The contribution of afferent signals from the liver to metabolic regulation during exercise. **Can J Physiol Pharmacol.** 2002; 80(11):1035-44.
- Le Mével J, Beraud G, Maniey J. Influence de sexe sur les modalités de réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien aux agressions émotionnelles et somatiques chez le rat. **C. R. Soc. Biol.** 1970; 164: 2106-2113.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Integração e Regulação Hormonal do metabolismo dos mamíferos. In *Princípios de Bioquímica*, Sarvier (ed). São Paulo, 2002; 552-89.
- Lescoat G. Influence de sexe sur les modalités de réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien aux agressions émotionnelles et somatiques chez le rat. **Comp. Rend. Soc. Biol.** 1970; 183:159-169.
- Lin ECC. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Ann. Rev. Biochem.** 1977; 46: 765-95.
- Liu S, Baracos VE, Quinney HA, Clandinin C. Dietary fat modifies exercise-dependent glucose transport in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** 1996; 80(4): 1219-24.
- Lo S, Rousseau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.** 1970; 28(2): 234-6.
- Long JA, Evans HM. The estrus cycle in the rat and its associated phenomena. **Mem. Univ. Calif.** 1922; 6: 1-148.
- MacNiven E, de Catanzaro D, Younglay EV. Chronic stress increases estrogen and other steroids in inseminated rats. **Physiol. Behav.** 1992; 52: 159-62.
- Mandl A M. The phases of the estrous cycle in the adult white rat. **J Exp Biol**, 1951; 28: 576-84.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the Estrous Cycle phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Braz J Biol.** 2002; 62(4): 609-14.
- Marcondes FK, Mello L L, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influence the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, 2001; 74(4-5): 15-20.

- Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influence on the hormonal response of female rats submitted to stress. VII World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Florença - Itália, 15-20/07/2000.
- Marcondes FK, Vanderlei LCM, Lanza LLB, Spadari-Bratfisch RC. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1996; 74: 663-9.
- Marcondes FK, Santos IN, Spadari-Bratfisch RC. Steroid hormones and stress-induced subsensitivity to catecholamines. XIIIth International Congress of Pharmacology, Munique, Alemanha. **Naunyn-Shmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 1998; 358(1-suppl.2): R594.
- Mark AL, Victor C, Nerhed C, Wallin, BG. Microneurographic studies of the mechanisms of sympathetic nerve responses to static exercise in humans. **Circ Res.** 1985; 57: 461-9.
- Marple DN, Aberle ED, Forrest JC, Blake WH, Judge MD. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. **J. Anim. Sci.** 1972; 35 (3): 576-9.
- Marrone BB. Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycle, castration and steroid replacement. **Physiol. Behav.** 1976; 17: 419-25.
- Marvan ML, Chavez-Chavez L, Santana S. Clomipramine modifies fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. **Arch. Med. Res.** 1996; 28:83-6.
- Marvan ML, Santana S, Chavez-Chavez L, Bertan M. Inescapable shocks accentuate fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. **Arch. Med. Res.** 1997; 28: 369-372, 1997.
- Mason JW. A review of psychoendocrine on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom. Med.** 1968a; 30: 576-607.
- Mason JW. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. **Psychosom. Med.** 1968b; 30: 631-53.
- Mcardle WD, Katch FI, Katch VL **Fisiologia do exercício: Energia, nutrição e desempenho humano.** 4. ed., ed. Guanabara-Koogan, Brasil, 1998.
- McEwen BS. Definitions and Concepts of Stress. In: Fink, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress.** USA: Academic Press, v. 3, 2000.

- McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides **Clin Chem**. 1983; 29(3): 538-42.
- Miller SB, Sita A. Estrogen. *In*: Fink, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, v. 2, 2000.
- Miyahara S, Komori T, Fujiwara R, Shizuya K, Yamamoto M, Ohmori M, Okazaki Y. Effects of single and repeated stresses on the expression of mRNA for α_1 -adrenoceptors in the rat hypothalamus and midbrain. **Eur J Pharmacol**. 1999; 379(1): 111-4.
- Myers SR, Biggers DW, Cherrington AD. Intraportal glucose delivery enhances the effects of hepatic glucose uptake in vivo. **J. Clin. Invest**. 1991; 88:158-67.
- Nakashima T, Noguchi T, Furukawa T, Yamasaki M, Makino S, Miyata S, Kiyohara T. Brain oxytocin augments stress-induced long-lasting plasma adrenocorticotrophic hormone elevation in rats. **Neuroscience**, 2002; 321: 161-4.
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN. Effect of Stressor Intensity on Habituation of the Adrenocortical Stress Response. **Physiol. Behav.** 1998; 43:41-6.
- Nequin LG, Schwartz NB. Adrenal participation in the timing of mating and LH release in cyclic rat. **Endocrinology**. 1971; 88: 325-31.
- Nesse RM, Young EA. Evolutionary origins and function of the stress response. *In*: Fink, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, v. 1, 2000.
- Niklasson M, Daneryd P, Lonnroth P, Holmang A. Effects of exercise on insulin distribution and action in testosterone-treated oophorectomized female rats. **J. Appl. Physiol**. 2002; 88:2116-22.
- Östman-Smith I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long-term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. **Acta Physiol. Scand**. 1979; (Suppl. 477): 1-118.
- Ottenweller J. E. Animals Models (Nonprimate) for Human Stress. *In*: Fink, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, v. 1, 2000.
- Pacak K, McCarty R. Acute Stress Response: Experimental. *In*: Fink, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, v. 1, 2000.

- Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kveňstansky R, Kopin IJ. Heterogenous neurochemical responses to different stressors: a test of Seyle's doctrine of nonspecific. **Am. J. Physiol.** 1998; 275: R1247-55.
- Palkovits M. Neuropeptide messenger plasticity in the CNS neurons following axotomy. **Mol. Neurobiol.** 1995; 10: 91-103.
- Palkovits M. Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. **Eur. J. Pharmacol.** 2000; 405: 161-6.
- Paré WP, Redei E. Sex differences and stress response of WKY rats. **Physiol. Behav.** 1993; 54: 1179-85.
- Pauletto P, Scannapieco G, Pessina AC. Sympathetic drive and vascular damage in hypertension and atherosclerosis. **Hypertension.** 1971; 17(III): 75-81.
- Pavlidis C, Nivon LG, McEwen BS. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. **Hippocampus.** 2002; 12(2):245-57.
- Perdensen SB. Identification of steroid receptors in human adipose tissue. **Eur. J. Clin. Invest.** 1996; 26: 1051-6.
- Pickering AD. The concept of biological stress. *In*: Pickering (Ed.). **Stress and fish.** New York: Academic Press, 1981.
- Pittner RA, Fears R, Brindley DN. Effects of cyclic AMP, glucocorticoids and insulin on the activities of phosphatidase phosphohydrolase, tyrosine aminotransferase and glycerol kinase in isolated rat hepatocytes in relation to the control of triacylglycerol synthesis and gluconeogenesis. **Biochem. J.** 1985; 225: 455-62.
- Plas-Roser S, Aron C. New data concerning the control by the adrenals of sexual receptivity in the rat. **Physiol. Behav.** 1977; 19: 57-60.
- Pollard I. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization to sexual status in the female laboratory rats. **Behav. Biol.** 1975; 14: 103-8.
- Popovic M, Popovic N. Estrus cycle and gastric lesions in individual- and group-stressed female rats. **Int. J. Psychophysiol.** 1999; 33 (1): 21-6.
- Porte D. Sympathetic regulation of insulin secretion. **Arch. Int. Med.** 1973; 123: 252-60.
- Porte D, Ellis S. Isoproterenol- and epinephrine-induced changes in blood glucose and tissue glycogen levels in normal and diabetic rats: the influence of alteration in

- endogenous insulin levels and state of nourishment. sympathetic regulation of insulin secretion. **Arch. Int. Med.** 1973 127: 354-60.
- Radziuk J, Pye S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. **Diabetes Metab Res Ver.** 2001; 17(4): 250-72.
- Radziuk J. Assessment methods of carbohydrate metabolism in the liver (glycogenolysis, gluconeogenesis, and glycogen synthesis). In *Clinical Research in Diabetes and Obesity*, vol. I (methods, Assessment, and Metabolic Regulation), Draznin B, Rizza R (eds). Humana Press:Totowa, 171-204, 1997.
- Radziuk J. Insulin Sensitivity and Its Measurement: Structural Commonalities among the Methods. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** 2001; 85(12): 4426-33.
- Rebuffe-Scrive M. Sex steroids hormones and adipose tissue metabolism in ovariectomized and adrenalectomized rats. **Acta Physiol. Scand.** 1987; 129(4): 471-7.
- Redei E, Li L, Iddako H, McGivern RF, Aird F. Fast glucocorticoid feedback inhibition of ACTH secretion in the ovariectomized rat: effect of chronic estrogen and progesterone. **Neuroendocrinology.** 1994; 60: 113-23.
- Riegle GD. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. **Neuroendocrinology**, 1973; 11: 1-10.
- Ritcher EA, Sonne B, Mikines KJ, Ploug T, Galbo H. Endurance training augments the stimulatory effect of epinephrine on oxygen consumption in perfused skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** 1984; 52(3): 346-50.
- River C. Gender, Sex Steroids, Corticotropin-Releasing Factor, Nitric Oxide, and the HPA Response to Stress. **Pharmacol Biochem Behav**, 1999; 64(4): 739-51.
- Rowell LB, O'Leary, DS. Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes. **J. Appl. Physiol.**, 1990; 69: 407-18.
- Ryan C, Ferguson K, Radziuk J. Glucose dynamics and gluconeogenesis during and after prolonged swimming in rats. **J. Appl. Physiol.** 1993; 74(5): 2404-11.
- Saltin B. Human skeletal muscle fibers-properties and function. **Lakartidningen.** 1977; 74(44): 3878-83.
- Sancho MJ, Gomez-Munoz A, Sanchez-Bueno, A. & Trueba M, Marino A. Glycogen phosphorylase activation by progesterone in liver. **Exp. Clin. Endocrinol.** 1988; 92(2): 154-60.

- Sapolsky RM. **Stress in the wild**. Scientific American,106-113, 1990.
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 1936; 138(1): 32.
- Shors TJ, Pickett J, Wood G, Pacynski M. Acute Stress Persistently Enhances Estrogen Levels in the Female Rat. **Stress**. 1999; 3(2): 163-71.
- Shulman RG, Bloch G, Rothman DL. In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 1995; 92: 8835-52.
- Silva ISF. Estudo de uma via indireta do feedback positivo dos esteróides ovarianos: papel do Locus Coeruleus. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 127 p., 2001.
- Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitivity lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid Res**. 1994; 35: 1535-41.
- Smith ER, Bowers CY, Davidson JM. Circulation levels of plasma gonadotropins in 4 and 5 day cycling rats. **Endocrinology**, 1973; 93: 756-8.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotrofin and steroids levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**. 1975; 96(1): 219-26.
- Souza HM, Hell NS, Lopes G, Bazotte RB. Synergic effect of counter regulatory hormones during insulin-induced hypoglycemia in rats: participation of lipolysis and gluconeogenesis to hyperglycemia. **Chung Koo. Yao. Li. Hsueh. Pao**. 1996; 175(5): 455-9.
- Suàrez M. Influence of Anterodorsal Thalamic Nuclei on The Hypophyseal-Adrenal Axis Cardiac β receptors in Rats Submitted to Variable Chronic Stress. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam**, 1989; 49(2): 71-8.
- Tanno AP, Bianchi FJ, Moura MJCS, Marcondes FK. Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. **Life Sciences**. 2002; 71(25): 2973-81.
- Tarnopolsky M, Ruby BC. Sex differences in carbohydrate metabolism. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. 2001; 4: 521-6.
- Taylor M J. Hypotermia. *In*: Fink, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. USA: Academic Press, v. 2, 2000.

- Titov VN, Pitsin DG. The effect of glucose and cycloheximide on glycerolipid biosynthesis in the rat liver. **Vopr. Med. Khim.** 1985; 31(6): 35-40.
- Trinder P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J Clin Pathol.** 1969; 22(2): 246.
- Van Dijken HH, De Goeij DCE, Sutanto W, Mos J, De Kloet ER, Tilders FJH. Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. **Neuroendocrinol.** 1993; 658: 57-64.
- Verago JL. Concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilgliceróis em resposta à infusão de agonistas beta-adrenérgicos em ratos submetidos a estresse por choque nas patas. **Tese de Mestrado.** Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 69 p., 2000.
- Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology.** 1991; 129(5): 2503-11.
- Vogel WH, Jenhs R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. **Neurosc. Lett.** 1988; 87: 183-8.
- Yamaguchi N. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1991; 70: 167-206.
- Young WC, Boling JL, Blandau R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. **Anat. Rec.** 1945; 80: 37-45.
- Wahrenberg H, Engfeldt P, Bolinder J, Arner P. Acute adaptation in adrenergic control of lipolysis during physical exercise in humans. **Am. J. Physiol.** 1987; 253E:383.
- Wasserman DH, Cherrington AD. Hepatic fuel metabolism during muscular work: Role end regulation. **Am. J. Physiol.** 1991; 260E: 811.
- Zelena D, Halleer J, Halazask J, Makara GB. Social stress of variable intensity: Physiological and behavioral consequences. **Brain Res Bul,** 1999; 48(3): 297-302.
- Zschaek LL, Wurtman RJ. Brain 3 H-catechol syntheses and the vaginal estrous cycle. **Neuroendocrinology.** 1973; 11(3): 144-9.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 390-1, sobre "INFLUÊNCIA DO SEXO, DO CICLO ESTRAL E HORMÔNIOS SEXUAIS SOBRE A RESPOSTA CONTRÁTIL VASCULAR O METABOLISMO E O COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE" sob a responsabilidade de

..... está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 27.06.1.2002

Campinas, 07 de junho de 2002

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº "....., entitled "....."

..... is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on 1/1.

Campinas 07 de junho de 2002.

Alba R. M. Souza Brito
Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP