

Fernanda Klein Marcondes

Influência do Sexo e das Fases do Ciclo Estral
sobre a Reação de Estresse em Ratos

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas na área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Célia Spadari-Bratfisch

Campinas
1995



Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Fernanda Klein Marcondes e aprovada pela Comissão Julgadora.

15/08/95

R.P.C.

185156

UNIDADE	2C
N.º CHAMADA	UNICAMP M333i
V. E.	
PREÇO	R\$ 25.668
PROG.	433/95
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/09/95
N.º CPD	

CM-00077088-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

M333i

Marcondes, Fernanda Klein
Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a
reação de estresse em ratos / Fernanda Klein Marcondes.
-- Campinas, SP: [s.n.]. 1995.

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

1. Adrenalina. 2. Corticosterona. 3. Ciclo sexual.
4. Natação. 5. Estro. 6. Receptores de substâncias
endógenas. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

“O estresse é uma parte integral da fábrica natural da vida e vencer os estímulos estressantes é um requisito diário para o crescimento e desenvolvimento humanos normais”*.

* Spielberg apud Franks, 1994.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho e, em especial:

- A meus pais, pelo amor, pela educação e pelo estudo.
- A meus irmãos, Flavia e Fabricio, pelo carinho e confiança.
- À Prof^a Dr^a Regina Célia Spadari-Bratfisch, pela orientação e incentivo em minha vida acadêmica.
- Ao Prof. Ademir Petenate pelo auxílio na análise estatística.
- Ao Márcio Linardi, por seu exemplo no laboratório.
- À Vandi, pelo auxílio no trabalho experimental.
- Às Prof^{as} Dr^{as} Ana Lúcia Favaretto, Maria Cristina C. Gomes e Nancy A. Teixeira pela análise prévia da tese.
- Ao Freddy, pelos ensinamentos de computação e pelos bons momentos.
- À Salete, pela amizade e paciência.
- À Andrea e Marcel pela amizade e convivência.
- Aos amigos Adriana, Angela, Eliana, Claudia, Angelina, Zezé, Luiz, Eduardo, Bruno e Elisângela pelo carinho e companheirismo.
- Ao Prof. Dr. Ernesto D'Ottaviano e ao Dr. Roger Abdelmashi, por tornarem, possível algumas dosagens hormonais.
- Às secretárias Sônia e Elídia pela boa vontade com que sempre me atenderam.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela oportunidade de realizar este trabalho.
- Ao CNPq, FAPESP e FAEP, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Animais.....	9
3.2. Determinação das fases do ciclo estral	9
3.3. Estresse por natação.....	9
3.4. Átrio direito isolado.....	10
3.5. Curvas dose-resposta	11
3.6. Coleta de sangue	11
3.7. Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona	13
3.8. Farmacos e Soluções.....	13
3.9. Análise estatística	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Estresse Único.....	15
4.1.1 Frequência inicial.....	15
4.1.2. Sensibilidade à isoprenalina.....	16
4.1.3. Sensibilidade à noradrenalina	19
4.1.4. Sensibilidade à adrenalina.....	22
4.1.5. Concentrações plasmáticas de corticosterona.....	25
4.2. Estresse Repetido	28
4.2.1 Frequência inicial.....	28
4.2.2. Sensibilidade à isoprenalina.....	29
4.2.3. Sensibilidade à noradrenalina	32
4.2.4. Sensibilidade à adrenalina.....	34
4.2.5. Concentrações plasmáticas de corticosterona.....	36
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ABSTRACT	58

RESUMO

Estudamos a influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos submetidos à natação, a 30°C. Analisamos as alterações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados e as concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos machos e de ratas em estro ou em diestro submetidos a uma sessão de 5, 15, 30 ou 50 min de natação (estresse único), ou a três sessões de 5, 15 e 30 min, aplicadas em dias consecutivos. Em fêmeas, as sessões repetidas ocorreram durante o diestro, proestro e estro (grupo estro) ou durante o estro, metaestro e diestro (grupo diestro).

Curvas dose-resposta à isoprenalina, noradrenalina e adrenalina foram obtidas em átrios direitos isolados de ratos após 30 ou 50min de natação, ou após a última sessão do estresse repetido. O sangue foi coletado da veia renal esquerda, sob anestesia com pentobarbital, para determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona por fluorimetria.

Átrios direitos isolados de ratos machos submetidos à natação não apresentaram alterações de sensibilidade às catecolaminas. O tecido isolado de ratas em estro apresentaram subsensibilidade à isoprenalina após uma sessão de 50 min de natação. Átrios direitos isolados de ratas em diestro, desenvolveram subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina após uma sessão de 50 min de natação ou após o estresse repetido.

Em ratos machos, as concentrações plasmáticas de corticosterona aumentaram após 5, 15 ou 30 min de natação, mas não após 50 min. Em ratas, houve aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em todos os grupos experimentais, mas o perfil de variação foi diferente daquele observado em machos. Houve grande variação na resposta hormonal ao estresse por natação dentro de cada grupo analisado.

Em resposta ao estresse repetido, machos e fêmeas apresentaram elevação nos níveis plasmáticos de corticosterona após cada uma das sessões de natação. Entretanto, enquanto em machos os níveis aumentaram ainda mais após a última sessão, em fêmeas o aumento foi menor do que nas duas sessões anteriores.

Nossos resultados demonstraram que o sexo e o ciclo estral exercem importante influência sobre a reação de estresse em ratos submetidos à natação. Aumentos significativos nos níveis plasmáticos de corticosterona são necessários, porém não suficientes, para induzir alterações de sensibilidade às catecolaminas. Há também uma grande variação individual na resposta hormonal à natação.

1. INTRODUÇÃO

A compreensão do termo estresse está baseada em experimentos de Hans Selye datados do início do século. 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. Para sua surpresa, entretanto, os ratos do grupo controle, que haviam recebido injeção de solução salina, apresentaram alterações semelhantes. Selye concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções. Encontrou o mesmo resultado expondo animais ao frio, a patógenos, a toxinas ou ao barulho (SELYE, 1936; SAPOLSKY, 1990).

Com base nestes resultados, SELYE (1936) descreveu a Síndrome Geral da Adaptação, que representa uma reação geral e inespecífica do organismo a estímulos aversivos ou a situações desconhecidas, cuja finalidade seria a adaptação do animal à nova condição. Posteriormente propôs o termo estresse. Segundo a definição original, estresse representa a resposta do organismo, enquanto que o seu agente causador é definido como estímulo ou agente estressante ou estressor (PICKERING, 1981).

A natureza inespecífica da reação de estresse foi revista por diferentes autores, segundo os quais, a intensidade da resposta obtida varia com a qualidade e intensidade do agente estressante (MASON, 1968a, 1968b; HENNESSY et al., 1979; HERD, 1991).

Fatores individuais tais como características genéticas (MARPLE et al., 1972), sexo (LESCOAT et al., 1970; ANISHCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993) e idade (RIEGLE, 1973; BÁNKY et al., 1994) 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 & JENSH, 1988; GRIFFIN, 1989).

A reação de estresse pode ser dividida em três fases: 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, a capacidade de reação diminui e 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 distúrbios renais, cardiovasculares, gastrointestinais e/ou imunológicos (SELYE, 1936; MEERSON, 1984).

Embora a reação de estresse possa resultar em doenças, é ela que torna possível a sobrevivência e a adaptação dos seres vivos frente aos inúmeros estímulos ambientais a que estão constantemente expostos (FRASER et al., 1975, CHROUSOS & GOLD, 1992).

Muitas estruturas cerebrais estão envolvidas na organização das respostas a estímulos aversivos ou desconhecidos (VAN DER KAR et al., 1991). O sistema límbico, ao ser estimulado, age sobre o eixo hipotálamo-hipofisário alterando a secreção

hiporfisária dos hormônios adrenocorticotrófico (HOKFELT et al., 1983), do crescimento (KRULICH et al., 1974; SEGGIE & BROWN, 1975; HOKFELT et al., 1983), luteinizante (KRULICH et al., 1974; EUKER et al., 1975), folículo-estimulante (KRULICH et al., 1974) e de prolactina (EUKER et al., 1975; SEGGIE & BROWN, 1975). Também ocorrem alterações nos níveis e de β -endorfina (KANT et al., 1983).

O aumento dos níveis plasmáticos de ACTH determina uma maior secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal (AXELROD & REISINE, 1984). Simultaneamente, ocorre ativação do Sistema Nervoso Simpático e da medula adrenal, o que resulta em aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (CANNON et al., 1927; AXELROD & REISINE, 1984; NATELSON et al., 1988).

As ações fisiológicas das catecolaminas, no organismo, ocorrem por meio de sua interação com os adrenoceptores, identificados por AHLQUIST (1948), e inicialmente classificados em dois tipos: alfa (α) e beta (β). Atualmente, aceita-se que existam três subgrupos de adrenoceptores: α_1 , α_2 e β , que diferem entre si quanto à sequência de aminoácidos de sua estrutura proteica (BYLUND et al., 1994), quanto à afinidade a agonistas e antagonistas adrenérgicos (BYLUND et al., 1994), e quanto ao sistema de segundo mensageiro a que estão acoplados: aumento de fosfatidil inositol e cálcio citoplasmáticos - receptores α_1 ; diminuição dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) - receptores α_2 ; e aumento dos níveis intracelulares de AMPc - receptores β (LANDS et al., 1967; LANDSBERG & YOUNG, 1992).

A resposta dos tecidos às catecolaminas é resultante não só de sua interação com os receptores adrenérgicos, e dos eventos intracelulares que se seguem a essa interação, mas também da atividade dos sistemas de metabolização das catecolaminas: a recaptção neuronal e a captação extraneuronal.

A noradrenalina é o principal substrato do sistema de recaptção neuronal, no qual as catecolaminas são recaptadas pelas terminações nervosas (SHORE, 1972; SLOTKIN & BAREIS, 1980) e inativadas pela enzima monoamino-oxidase (MAO) (TRENDELENBURG et al., 1972; ABELL, 1987; TRENDELENBURG, 1991). No segundo mecanismo, as catecolaminas são captadas por células não nervosas do tecido e são metabolizadas por ação da enzima catecol-orto-metil transferase (COMT), sendo a isoprenalina e a adrenalina os principais substratos deste sistema (EISENFELD et al., 1967; TRENDELENBURG & GRAEFE, 1975; TRENDELENBURG, 1978; BÖNISCH et al., 1978; BÖNISCH, 1980).

Diversos fatores alteram a eficiência destes dois sistemas, entre os quais os hormônios esteróides. Em ratos, os principais inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas são a corticosterona e o estradiol (IVERSEN & SALT, 1970). MA et al. (1993) demonstraram que o tratamento com estradiol pode diminuir em 35% a atividade da MAO em células da linhagem SK-ER3 de neuroblastoma humano, enquanto que SAARIKOSKI (1988) também observou diminuição da atividade da MAO e da COMT em placenta humana por ação do estriol e da progesterona.

Em ratas, a atividade da enzima MAO, em diferentes órgãos, varia ao longo do ciclo reprodutivo ou estral. Este caracteriza-se por apresentar uma duração média de 4 a 5

dias e é formado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, sendo o proestro a fase ovulatória (LONG & EVANS, 1922). Nos ovários e adrenais, a atividade da MAO é mínima na noite entre o estro e o metaestro, e é alta no diestro. No útero, a atividade desta enzima atinge o pico no metaestro (HOLZBAUER & YAUDIM, 1973). No hipotálamo, amígdala e córtex frontal, a atividade enzimática é mínima durante o diestro, e progressivamente aumenta, chegando ao pico durante o estro (ZOLOVICK et al., 1966).

Diversos fatores, entre os quais variações da concentração de agonistas adrenérgicos, podem modular a função dos adrenoceptores, alterando a sua densidade e/ou afinidade ou ainda, interferindo com os componentes dos sistemas de segundos-mensageiros e seu acoplamento (DAVIES & LEFKOWITZ, 1984).

A resposta dos tecidos periféricos à estimulação adrenérgica também pode ser substancialmente modificada por alterações de temperatura, composição química do plasma e níveis circulantes de vários hormônios (LANDSBERG & YOUNG, 1992), tais como hormônios tireoidianos (KUPFER et al., 1986), glicocorticóides (DAVIES & LEFKOWITZ, 1984; MALBON & HADCOCK, 1988), estrógenos (ROBERTS et al., 1977; FREGLY et al., 1978; ROBERTS et al., 1979; LEVIN et al., 1980; ROBERTS et al., 1981; KLANGKALYA & CHAN, 1988; CONDON et al., 1989) e progesterona (KANO, 1982; MOAWAD et al., 1982; HATJIS et al., 1988).

Alterações da sensibilidade adrenérgica também podem ser causadas pelas modificações de natureza neural e hormonal ligadas à reação de estresse. Observou-se alteração da resposta cronotrópica às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a estresse por frio (HARRI et al., 1974; CALLIA, 1981; CALLIA & DE MORAES, 1984), choque nas patas (BASSANI & DE MORAES, 1986; 1987), imobilização (CAPAZ & DE MORAES, 1988) ou natação (SPADARI, 1985).

Em resposta ao estresse por 50 min de natação, a 35°C, átrios direitos isolados de ratos machos desenvolveram supersensibilidade ao efeito cronotrópico da isoprenalina. Esta alteração está relacionada à inibição do sistema de captação extra-neuronal de catecolaminas pela corticosterona (SPADARI et al., 1988). Por outro lado, após três sessões de natação, o tecido desenvolveu subsensibilidade à noradrenalina e à isoprenalina, acompanhada por alteração da constante de dissociação do antagonista de adrenoceptores β_1 , metoprolol (SPADARI & DE MORAES, 1988). A adrenalectomia bilateral impediu o aparecimento de tais alterações, de modo que os autores concluíram que os altos níveis plasmáticos de corticosterona, secretados em resposta ao estresse, estavam relacionados, ao menos parcialmente, a tais alterações de sensibilidade.

NOURANI et al. (1992) demonstraram que o estresse por choque nas patas determinou o desenvolvimento de supersensibilidade à isoprenalina, em átrio direito isolado de ratos, e que este efeito era bloqueado por administração de um antagonista dos receptores citosólicos de corticosterona. A infusão de um agonista destes receptores, a ratos não submetidos a estresse, induziu supersensibilidade à isoprenalina, demonstrando novamente a participação da corticosterona no processo de alteração de sensibilidade às catecolaminas. CAPAZ & DE MORAES (1988) demonstraram que também a

subsensibilidade do átrio direito à noradrenalina pode ser induzida por infusão de corticosterona em animais normais, não submetidos a estresse.

Em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse também foram detectadas alterações de sensibilidade às catecolaminas, sendo estas dependentes da intensidade e da frequência de apresentação do agente causador de estresse e da fase do ciclo estral (BENCHIMOL & SPADARI, 1992; MARCONDES & SPADARI, 1992; RODRIGUES, 1993).

Átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, em dias consecutivos, e sacrificadas em diestro, desenvolveram subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina (BENCHIMOL & SPADARI, 1992), como havia sido demonstrado em ratos submetidos ao mesmo protocolo experimental (BASSANI & DE MORAES, 1986; 1987). Por outro lado, quando as ratas, após três sessões de choques, foram sacrificadas no estro, não houve alteração de sensibilidade às catecolaminas (BENCHIMOL & SPADARI, 1992).

RODRIGUES et al. (1993) demonstraram que o estresse por uma sessão de natação, a 35°C, determinou o desenvolvimento de supersensibilidade à isoprenalina, em átrios direitos isolados de ratas em diestro, a qual estava relacionada aos níveis plasmáticos de corticosterona.

Além disso, foi demonstrado que, em ratas normais, não submetidas a estresse, a sensibilidade do tecido atrial, à adrenalina, é maior durante o proestro em relação às demais fases do ciclo estral (RODRIGUES et al., 1995). As autoras sugeriram que esta alteração era resultante da inibição do sistema de captação extraneuronal das catecolaminas pela corticosterona, cujos níveis atingiram o pico também durante o proestro (RODRIGUES et al., 1995).

Em ratos normais, os níveis plasmáticos de corticosterona apresentam grandes flutuações circadianas. Sendo um animal de hábito noturno, o rato apresenta o seu mais alto nível plasmático de corticosterona antes do início do período de escuro, enquanto que os níveis mais baixos são observados pela manhã (TORRELLAS et al., 1981).

Ratos e ratas apresentam grandes diferenças quanto ao ritmo circadiano de secreção de corticosterona, ACTH e fator liberador de corticotrofina hipotalâmico (HIROSHIGE & WADA-OKADA, 1973). Em ratas, os níveis plasmáticos de corticosterona, bem como aqueles do ACTH, de gonadotrofinas e dos esteróides gonadais variam em consonância com as fases do ciclo estral (FREEMAN, 1988).

Analisando ratas normais, RAPS et al., (1971), PHYLLIPS & POOLSANGUAN (1978) e BARON & BRUSH (1979) detectaram os maiores níveis plasmáticos de corticosterona durante o proestro em relação às demais fases do ciclo. Além desta diferença também foram detectadas concentrações mais elevadas de corticosterona no diestro (BARON & BRUSH, 1979) e no metaestro (RODRIGUES et al., 1992), em relação ao estro.

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 hipotálamo-hipófise-adrenal (LE

MÉVEL et al., 1982; DUPOUY et al., 1987). Em resposta à imobilização (HALEEM et al., 1988), 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 a 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). Este autor sugeriu que a hipófise de ratas poderia apresentar uma maior secreção de ACTH em resposta a estímulos estressantes.

Foi demonstrado também que o dipropionato de estradiol potencializa o efeito do ACTH sobre o peso da glândula adrenal, e que a metil-testosterona apresenta efeito contrário. Este autor sugeriu que o estradiol poderia agir ao mesmo tempo sobre a secreção hipofisária de ACTH e sobre a sensibilidade da adrenal a este hormônio (GOMPertz, 1958).

COYNE & KITAY (1969) relataram que a velocidade de síntese de ACTH, medida pela incorporação de ^{14}C -fenilalanina a nível hipofisário, diminuiu após ovariectomia e que a injeção de estradiol restabelece a velocidade normal.

Além disso, a administração de estradiol a ratas (BURGESS & HANDA, 1992) e a ratos castrados (HANDA et al., 1994), resultou em maior secreção de corticosterona em resposta a estímulos estressantes em relação a animais que não receberam terapia hormonal substitutiva ou que foram tratados com testosterona.

Na hipófise, a densidade de receptores para glicocorticóides e para mineralocorticóides é menor em ratas do que em ratos. Em animais castrados não há diferença. Porém em ratas castradas e tratadas com estrógeno o efeito da castração é revertido (TURNER, 1990). Esta autora também demonstrou que o nível de receptores hipofisários para corticosteróides estão sujeitos a 20% de "down-regulation" pelos níveis circulantes de estrógeno. Estes dados parecem indicar que o menor número de receptores em fêmeas poderia explicar a reduzida sensibilidade à retro-alimentação negativa dos glicocorticóides a nível da hipófise (TURNER, 1990).

As fases do ciclo estral também influenciam a reação de estresse. A exposição a choques nas patas (POLLARD et al., 1975) ou a imobilização (VIAU & MEANEY, 1991), durante o proestro, resultaram em aumentos maiores nos níveis plasmáticos de corticosterona do que durante o estro ou o diestro. Já BARON & BRUSH (1979) observaram aumento significativo na corticosterona plasmática, após estresse por imobilização, apenas durante o estro.

Em vários tecidos, foram observados efeitos dos glicocorticóides e dos esteróides ovarianos sobre a resposta às catecolaminas ou diretamente sobre os receptores adrenérgicos.

MANO et al. (1979) observaram que a administração crônica de hidrocortisona determinou um aumento de 70% na densidade de receptores β -adrenérgicos e diminuição da afinidade dos mesmos pelo antagonista iodohidroxibenzilpindolol, em membranas pulmonares de ratos. Por outro lado, a adrenalectomia resultou em diminuição de 29% no número destes receptores sem alteração da afinidade dos mesmos pelo antagonista. Este efeito foi revertido pela

administração de hidrocortisona. Em células de pulmão humano (linhagem VA₂), o efeito deste glicocorticóide sobre o número dos receptores β -adrenérgicos foi semelhante (FRASER & VENTER, 1980).

Também foi observado aumento na densidade de receptores β_2 -adrenérgicos induzido pelo cortisol, e pelos glicocorticóides sintéticos dexametasona e “triamcinolone acetone”, na linhagem de células DDT₁ MF-2 derivadas de miosarcoma de canal deferente de hamster. O efeito da testosterona foi semelhante porém menos intenso (NORRIS et al., 1987).

O número de receptores β -adrenérgicos no útero de ratas é maior durante o estro e o proestro (KRALL et al., 1978), sugerindo um papel dos esteróides sexuais na regulação destes receptores.

O tratamento com estradiol induziu um aumento no número de receptores α -adrenérgicos e supersensibilidade à noradrenalina em útero (ROBERTS et al., 1977; 1981) e bexiga urinária de coelhas (LEVIN et al., 1980) e em neurônios hipotalâmicos secretores do fator liberador do hormônio luteinizante (LHRH) de cobaias fêmeas (CONDON et al., 1989). Em plaquetas de coelhas, o efeito foi inverso (ROBERTS et al., 1979). Da mesma forma, a administração aguda intra-venosa de estrógenos a ratos machos inibiu as respostas vasculares à noradrenalina “in vivo” e “in vitro” (KONDO et al., 1980).

Por outro lado, o tratamento com estradiol resultou em aumento na densidade dos receptores β -adrenérgicos uterinos de cobaias (HATJIS et al., 1988), mas diminuiu a resposta termogênica à noradrenalina em tecido adiposo marrom, em ratos machos (PUERTA et al., 1993). Em tecido cardíaco, a ovariectomia, seguida de terapia substitutiva com estradiol e progesterona, resultou em aumento na densidade de receptores β -adrenérgicos, com diminuição da afinidade pelo radioligante (KLANGKALYA & CHAN, 1988). Receptores de estradiol foram detectados nos átrios e aurículas de ratas (STUMPF & SAR, 1977).

A progesterona também alterou a densidade de receptores β -adrenérgicos no córtex frontal de ratas (MAGGI et al., 1985) e no útero (KANO, 1982).

Em ratas, os menores níveis de estradiol são observados durante o estro, ocorrendo aumento no metaestro para atingir o pico no proestro (BROWN-GRANT et al., 1970; NAFTOLIN et al., 1972; DUPON & KIM, 1973; BUTCHER et al., 1974; SHAIKI & SHAIKI, 1975; FREEMAN, 1988). Quanto à progesterona, ocorre um pico durante o metaestro e outro durante o proestro, sendo os menores níveis observados durante o diestro (HASHIMOTO et al., 1968; BUTCHER et al., 1974; NEQUIN et al., 1979; FREEMAN, 1988). DUPON & KIM (1973) detectaram um pico na secreção de testosterona durante o proestro.

A relação entre os níveis plasmáticos de corticosterona e dos hormônios sexuais parece ser muito complexa. KAMEL & KUBAJAK (1987) demonstraram que a corticosterona diminuiu o efeito estimulatório do estradiol, e aumentou o efeito inibitório da testosterona, sobre a secreção de LH em hipófise de ratas, “in vitro”. Estes resultados e a demonstração de que os esteróides sexuais alteram a secreção de ACTH e de

corticosterona em resposta ao estresse (BURGESS & HANDA, 1992; HANDA et al., 1994) sugerem que os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas estão intimamente interrelacionados.

Assim sendo, e considerando que, em ratos, o estresse é acompanhado de alterações de sensibilidade do átrio direito às catecolaminas; que estas alterações dependem da presença dos altos níveis de corticosterona; que ratas apresentam oscilações dos níveis basais deste hormônio durante o ciclo estral bem como durante a exposição a estímulos estressantes, nosso objetivo, neste trabalho, foi estudar os efeitos do estresse sobre a sensibilidade do átrio direito às catecolaminas, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre os efeitos do estresse em ratos.

Para isto, nos propusemos a:

1) Analisar a sensibilidade às catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e isoprenalina) de átrios direitos isolados de ratos machos, ratas em estro e em diestro submetidos ao estresse por natação.

2) Dosar os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos machos e de ratas em estro e em diestro submetidos à natação;

3) Avaliar a relação entre as alterações de sensibilidade adrenérgica, os níveis plasmáticos de corticosterona, o sexo e a fase do ciclo estral dos animais submetidos à natação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com 105 a 120 dias de idade, fêmeas pesando entre 175 e 250 gramas, e machos pesando entre 300 e 400 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos no Departamento de Fisiologia e Biofísica, alojados em gaiolas coletivas, com 5 animais no máximo em cada gaiola, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 7:00 h). Receberam, durante todo o período, água e ração para ratos (Purina) à vontade.

Os animais foram pesados no início da manipulação e imediatamente antes da primeira sessão de natação.

3.2. Determinação das fases do ciclo estral

A determinação das fases do ciclo estral foi feita diariamente entre 7:00 e 9:30 h, por meio de esfregaço vaginal, durante oito dias consecutivos (dois ciclos), no mínimo. Desprezaram-se as ratas que apresentaram ciclos irregulares, caracterizados por ausência ou permanência em uma das fases além do período médio normal (DRICKAMER, 1987). As ratas apresentando ciclos de 4 dias (proestro, estro, metaestro, diestro) foram utilizadas (SMITH et al., 1973). Nos dias em que os animais foram submetidos ao estresse, o esfregaço vaginal foi realizado imediatamente antes da natação.

Devido à realização do esfregaço vaginal, as fêmeas habituam-se à manipulação. Para eliminar esta variável, os machos também foram manipulados, durante um mínimo de oito dias, antes de serem utilizados.

3.3. Estresse por natação

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos à natação em um tanque de vidro medindo 100x50x60 cm, contendo água a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, em uma profundidade suficiente para que os animais não apoiassem a cauda no fundo do tanque (35 cm para fêmeas e 40-45 cm para machos). O estresse foi aplicado entre 7:20 e 10:10 h.

Utilizamos dois modelos de estresse:

O **ESTRESSE ÚNICO**, que consistiu em uma sessão de natação com duração de 30 ou 50 min aplicados em ratos machos, ratas em estro e em diestro. Os experimentos farmacológicos foram realizados imediatamente após a sessão de natação.

No **ESTRESSE REPETIDO**, os animais foram submetidos a três sessões de natação aplicadas em dias consecutivos, com duração de 5, 15 e 30 min, respectivamente. Após a primeira e/ou segunda sessões de natação (1^o e 2^o dias), os animais foram mantidos em ambiente aquecido, onde permaneceram por cerca de 45 minutos, até estarem secos, retornando em seguida para suas gaiolas. Os experimentos farmacológicos foram realizados imediatamente após a terceira sessão de natação, no 3^o dia. De acordo com dados anteriores, três sessões de natação não provocam alteração no ciclo reprodutivo. Assim sendo, em fêmeas, os grupos controle foram formados de acordo com a fase do ciclo estral do grupo experimental no terceiro dia, como está indicado na tabela 1.

Os animais dos grupos controles não foram submetidos a nenhum tratamento diferencial em relação aos grupos submetidos à natação, excetuando-se a não aplicação do estímulo estressante.

Tabela 1. Fases do ciclo estral de ratas submetidas ao estresse repetido.

Protocolo Experimental	Nº de sessões	Grupos Submetidos à Natação ^a	Grupos Controles ^a
ESTRO			
5, 15 e 30 min	3	D, P e E	E
DIESTRO			
5, 15 e 30 min	3	E, M e D	D

^a Fases do ciclo estral: Estro (E), Metaestro (M), Diestro (D) e Proestro (P).

3.4. Átrio direito isolado

Imediatamente após as sessões de natação, os animais foram sacrificados com um golpe na cabeça seguido de secção dos vasos cervicais. O tórax foi aberto e o coração removido. O átrio direito foi excisado e preparado para registro isométrico das contrações espontâneas, sob tensão diastólica de 0.5gf, em câmara para órgãos isolados, contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição [mM]: NaCl 115,0; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 2,5; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11. Este último foi adicionado para diminuir a oxidação das catecolaminas, durante a obtenção das curvas concentração-efeito. O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e a temperatura

mantida a $36,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, com auxílio de uma bomba de perfusão. Para registro das contrações espontâneas foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco Bio - System, modelo F-60, acoplado a um polígrafo Narco Bio - System, modelo DMP-4.

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

3.5. Curvas dose-resposta

Após o período de estabilização, foram obtidas curvas dose-resposta para a isoprenalina, noradrenalina ou adrenalina.

De acordo com dados anteriores, a realização de até três curvas dose-resposta em um mesmo átrio não provoca dessensibilização da preparação. Assim, sempre que possível, as curvas aos três agonistas foram obtidas no mesmo átrio. Ao final da curva dose-resposta à isoprenalina, o tecido era lavado com solução de Krebs-Henseleit até que a frequência retornasse ao nível obtido antes da realização da curva. Átrios que não retornaram a esta frequência não foram utilizados para a realização de outras curvas.

Foi utilizado o método cumulativo e os incrementos sucessivos da concentração molar do agonista foram de 0,5 unidade logarítmica. A resposta máxima foi determinada quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não alteraram a resposta obtida com a concentração imediatamente anterior.

A sensibilidade do átrio direito foi avaliada pela determinação do valor pD_2 , que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina 50% do efeito máximo, em experimentos individuais. Os valores pD_2 foram expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erros padrões.

3.6. Coleta de sangue

Para a dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona, outros animais foram submetidos à natação.

No modelo de **ESTRESSE ÚNICO**, ratos machos, ratas em estro e em diestro foram submetidos a uma sessão de natação com duração de 5, 15, 30 ou 50 min de natação, sendo anestesiados em seguida.

No **ESTRESSE REPETIDO**, os animais foram anestesiados após uma (5 min), duas (5 e 15 min) ou três (5, 15 e 30 min) sessões de natação, aplicadas em dias consecutivos. Para fêmeas, os grupos controles foram determinados de acordo com a fase do ciclo estral das ratas submetidas à natação, com está indicado na tabela 2. Os grupos

submetidos a um sessão de natação (5min) correspondem aos grupos “5 min” do modelo de estresse único.

Tabela 2: Fases do ciclo estral de ratas submetidas ao estresse repetido.

Protocolo Experimental	Nº de sessões	Grupos Submetidos à Natação ^a	Grupos Controles ^a
ESTRO			
5 min	1	E	E
5, 15 min	2	D, P	P
5, 15 e 30 min	3	D, P e E	E
DIESTRO			
5 min	1	D	D
5, 15 min	2	E, M	M
5, 15 e 30 min	3	E, M, D	D

^a Fases do ciclo estral: Estro (E), Metaestro (M), Diestro (D) e Proestro (P).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hipnol). O anestésico foi dissolvido em uma solução de NaCl a 0,9% e álcool etílico na proporção de 3:1 (v/v) e administrado por via intraperitoneal (75 mg/kg) entre 8:00 e 10:10 h. Após anestesia, os animais foram mantidos próximos a um aquecedor a fim de evitar hipotermia. A temperatura retal dos animais foi monitorada durante o período de anestesia.

Para eliminar o efeito da injeção sobre os níveis plasmáticos de corticosterona, a coleta de sangue foi realizada 40 min após a administração do anestésico (LESCOAT et al., 1970). Por meio de laparotomia, foram coletados aproximadamente 3 ml de sangue da veia renal esquerda, com seringa previamente heparinizada. O mesmo foi centrifugado por 15 min a 10.000 r.p.m., e o plasma foi separado e estocado a -20°C até o momento da dosagem.

3.7. Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona

Para a determinação dos níveis plasmáticos de corticosterona utilizamos o método fluorimétrico de ZENKER & BERNSTEIN (1958) modificado por MATTINGLY (1962).

Os esteróides foram extraídos do plasma em diclorometano. A adição de NaOH 0,1 N garantiu a destruição dos outros esteróides plasmáticos. A corticosterona foi convertida em um produto fluorescente pela adição de uma mistura ácido sulfúrico:etanol (7:3, v:v). A fluorescência foi medida em espectrofotofluorímetro Perkin - Elmer, modelo 204-a, nos comprimentos de onda de 475 nm para excitação e 520 nm para emissão. Para cada leitura foram feitas correções usando-se "brancos" e padrões adequados. As amostras foram analisadas em duplicata.

3.8. Fármacos e Soluções

Análises Farmacológicas:

Para a solução de Krebs-Henseleit foram utilizados sais de padrão analítico (A.C.S.) e água deionizada.

Os fármacos utilizados foram Adrenalina, Noradrenalina e Isoprenalina (Sigma Chemical Co).

As soluções-estoque foram preparadas em solução aquosa de ácido ascórbico a 2% e armazenadas a -20°C, por uma semana. As diluições foram feitas em solução de Krebs-Henseleit imediatamente antes do uso, e descartadas em seguida.

Coleta de sangue:

O anestésico utilizado foi o pentobarbital sódico (Hipnol - Laboratório Cristália), e como anticoagulante utilizamos heparina (Liquemine - Roche).

Dosagem de Corticosterona:

Corticosterona (Sigma Chem.Co)

Diclorometano (Merck S.A.)

Hidróxido de sódio (Química Moderna)

Etanol 95% (Merck, S. A.)

Ácido sulfúrico 96% (Carlo Erba)

A solução-estoque de corticosterona foi preparada em etanol absoluto e estocada a -20°C.

3.9. Análise estatística

Análise de Variância monofatorial, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas de médias foi utilizada para:

- a) comparar os valores de frequência inicial, resposta máxima, pD_2 e níveis plasmáticos de corticosterona do grupos controle entre si (machos, fêmeas em estro ou em diestro não submetidos a estresse);
- b) analisar o efeito do estresse sobre a resposta às catecolaminas e os níveis plasmáticos de corticosterona após uma sessão de natação, em animais do mesmo sexo e/ou na mesma fase do ciclo estral;
- c) avaliar o efeito do estresse sobre os níveis plasmáticos de corticosterona em animais submetidos a três sessões de natação.

O Teste t de Student foi utilizado para analisar o efeito do estresse sobre a resposta às catecolaminas após três sessões de natação, em animais do mesmo sexo e/ou na mesma fase do ciclo estral.

Para grupos que não apresentaram homogeneidade de variância, foi realizada transformação logarítmica dos dados antes da aplicação dos testes estatísticos (BOX et al., 1978; ZAR, 1984).

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas ao nível de 5%.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir e os efeitos do estresse único e do estresse repetido serão analisados separadamente.

Nas curvas dose-resposta o eixo das ordenadas apresenta a resposta do tecido em porcentagem da resposta máxima quando os grupos não apresentaram diferenças nestes valores. Havendo alteração de resposta máxima, a ordenada está expressa em batimentos por minuto. No eixo das abcissas estão representadas as doses do agonista utilizado, em logaritmo negativo da concentração molar.

4.1. Estresse único

4.1.1. Frequência inicial

Para a análise da frequência inicial, foram utilizados os dados obtidos após a montagem e estabilização da preparação, e imediatamente antes do início da primeira curva dose-resposta. Estes dados são apresentados na tabela 3. Não houve diferença de frequência inicial entre os animais dos grupos controles.

Átrios direitos isolados de machos e de fêmeas em estro submetidos à natação não apresentaram alteração de frequência inicial. Entretanto, átrios direitos isolados de fêmeas submetidas à natação durante o diestro apresentaram diminuição da frequência inicial após uma sessão de 30 min de natação em relação ao grupo controle (tabela 3).

Tabela 3 - Frequência inicial de átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a uma sessão de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	FI ^b (bat/min)
MACHO	Controle	6	272 ± 07
	30 min	6	263 ± 09
	50 min	5	278 ± 11
ESTRO	Controle	6	290 ± 15
	30 min	6	270 ± 05
	50 min	9	251 ± 11
DIESTRO	Controle	6	285 ± 08 253 ± 07 *
	30 min	7	270 ± 06
	50 min	7	

^a Número de animais. ^b Frequência inicial em batimentos por minuto (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

4.1.2. Sensibilidade à isoprenalina

Na tabela 4 são apresentados os dados de resposta máxima e pD_2 à isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos machos, fêmeas em estro ou em diestro submetidos a uma sessão de 30 ou 50 min de natação, e na figura 1 são ilustradas as respectivas curvas dose-resposta.

Entre os grupos controles, átrios direitos isolados de fêmeas em estro apresentaram resposta máxima à isoprenalina menor do que aqueles isolados de machos ou de fêmeas em estro (tabela 4), sem diferença de sensibilidade do tecido a esta catecolamina.

Não houve alteração de resposta máxima ou de sensibilidade à isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos e de ratas em diestro submetidos a uma sessão de natação (figuras 1a e 1b).

Entretanto, átrios direitos isolados de ratas em estro submetidas ao estresse único desenvolveram subsensibilidade à isoprenalina em relação ao grupo controle. Após a sessão de 30 min a curva dose-resposta à isoprenalina apresenta um desvio de 2 vezes à direita em relação ao controle ($F = 4,44$; $p = 0,088$). Após a sessão de 50 min de natação, a subsensibilidade passa a ser significativa ($p < 0,05$) e caracteriza-se por um desvio à direita de 2,24 vezes da curva dose-resposta à isoprenalina (figura 1b).

Tabela 4 - Resposta máxima e pD_2 da isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a uma sessão de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	Rm ^b (bat/min)	pD_2 ^c
MACHO	Controle	6	198 ± 07	8,69 ± 0,05
	30min	6	177 ± 14	8,90 ± 0,08
	50min	5	172 ± 11	8,78 ± 0,08
ESTRO	Controle	6	138 ± 12 †	8,83 ± 0,10
	30min	5	194 ± 15	8,51 ± 0,10
	50min	7	200 ± 21	8,48 ± 0,08 *
DIESTRO	Controle	6	170 ± 04 ††	8,74 ± 0,03
	30min	6	188 ± 12	8,60 ± 0,15
	50min	7	187 ± 19	8,54 ± 0,09

^a Número de animais. ^b Resposta Máxima (média ± erro padrão). ^c Valores pD_2 (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). † Estatisticamente diferente do grupo macho controle. †† Estatisticamente diferente do grupo estro controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

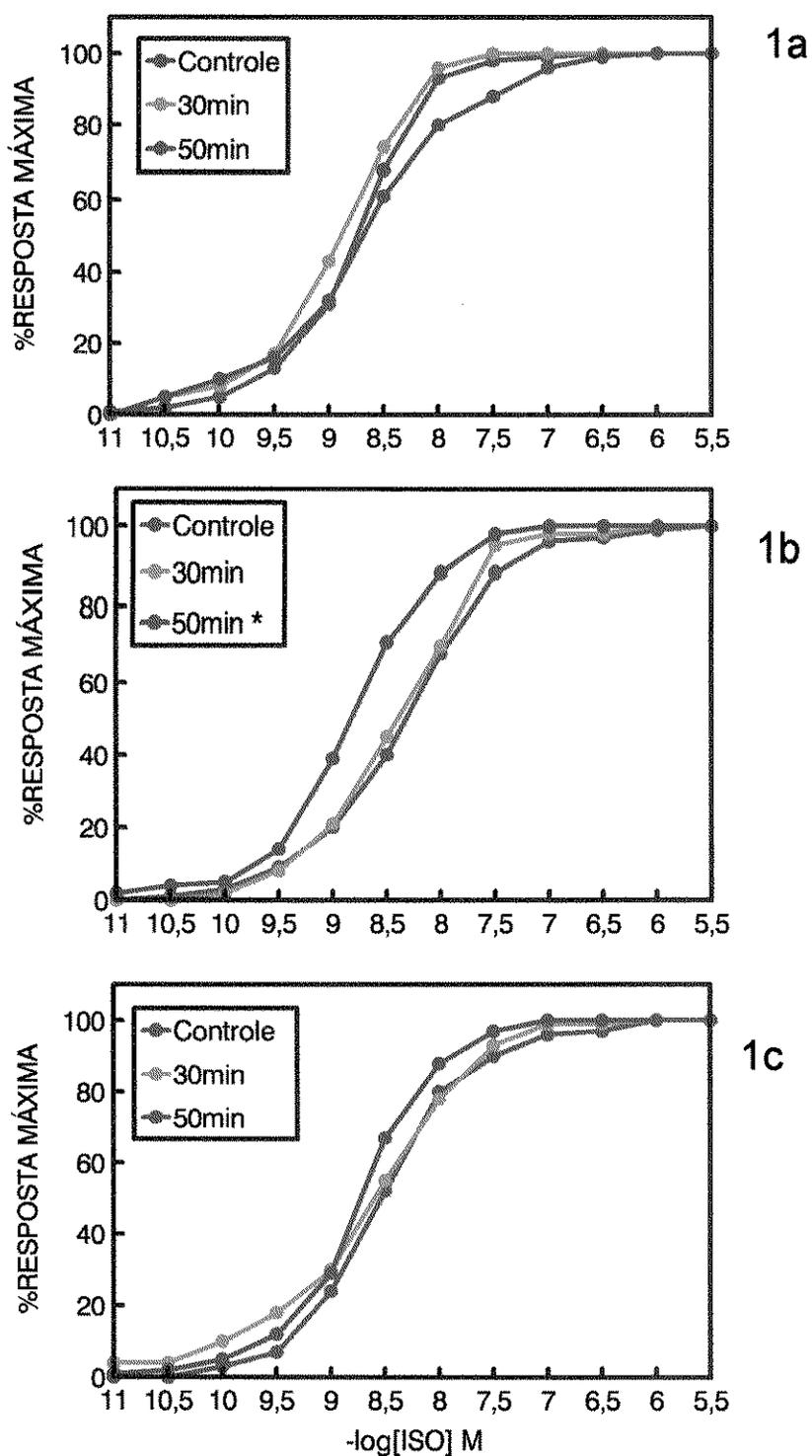


Figura 1 - Curvas dose-resposta à isoprenalina (ISO) em átrios direitos isolados de ratos machos (1a), ratas em estro (1b) e ratas em diestro (1c) submetidos a uma sessão de 30 ou de 50 min de natação. * indica diferença estatística em relação ao grupo controle nos valores de pD_2 ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

4.1.3. Sensibilidade à noradrenalina

A tabela 5 apresenta os valores de resposta máxima à noradrenalina e respectivos pD_2 de átrios direitos isolados de ratos machos, ratas em estro ou em diestro submetidos a uma sessão de natação.

A comparação entre animais dos grupos controles (tabela 5) mostrou que átrios direitos isolados de ratas em diestro apresentaram resposta máxima à noradrenalina menor do que o tecido isolado de ratos machos. A análise dos valores pD_2 desta catecolamina demonstrou que átrios direitos isolados de ratas em estro apresentaram-se subsensíveis quando comparados aqueles de ratos machos, e o tecido isolado de ratas em diestro apresentou-se supersensível em relação aquele isolado de ratas em estro (tabela 5).

O estresse por uma sessão não resultou em alterações de resposta máxima ou de sensibilidade à noradrenalina em átrios direitos isolados de ratos ou de ratas em diestro (figuras 2a e 2b).

Entretanto, o estresse único determinou o desenvolvimento de subsensibilidade a esta catecolamina em átrios direitos isolados de ratas em diestro. Foi observado um desvio à direita de 2,9 vezes ($F = 4,63$; $p = 0,086$) na curva dose-resposta após uma sessão de 30 min, que tornou-se significativo após a sessão de 50 min (figura 2c). Neste caso o desvio foi de 3,8 vezes ($p < 0,05$), em relação ao respectivo grupo controle (figura 2c).

A sensibilidade à noradrenalina foi semelhante em átrios direitos isolados de ratas controles em estro e submetidas a 50 min de natação durante o estro ou o diestro (tabela 5).

Tabela 5 - Resposta máxima e pD₂ da noradrenalina em átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a uma sessão de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	RM ^b (bat/min)	pD ₂ ^c
MACHO	Controle	6	200 ± 07	7,44 ± 0,07
	30min	6	182 ± 13	7,49 ± 0,15
	50min	5	188 ± 10	7,34 ± 0,26
ESTRO	Controle	7	176 ± 13	7,01 ± 0,13 †
	30min	5	184 ± 18	7,27 ± 0,16
	50min	7	176 ± 09	7,07 ± 0,16
DIESTRO	Controle	6	152 ± 13 †	7,67 ± 0,11 ††
	30min	6	187 ± 09	7,21 ± 0,16
	50min	6	173 ± 17	7,09 ± 0,16 *

^a Número de animais. ^b Resposta Máxima (média ± erro padrão). ^c Valores pD₂ (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle (p<0,05; Teste de Tukey). † Estatisticamente diferente do grupo macho controle (p<0,05, Teste de Tukey); †† Estatisticamente diferente do grupo estro controle (p<0,05; Teste de Tukey).

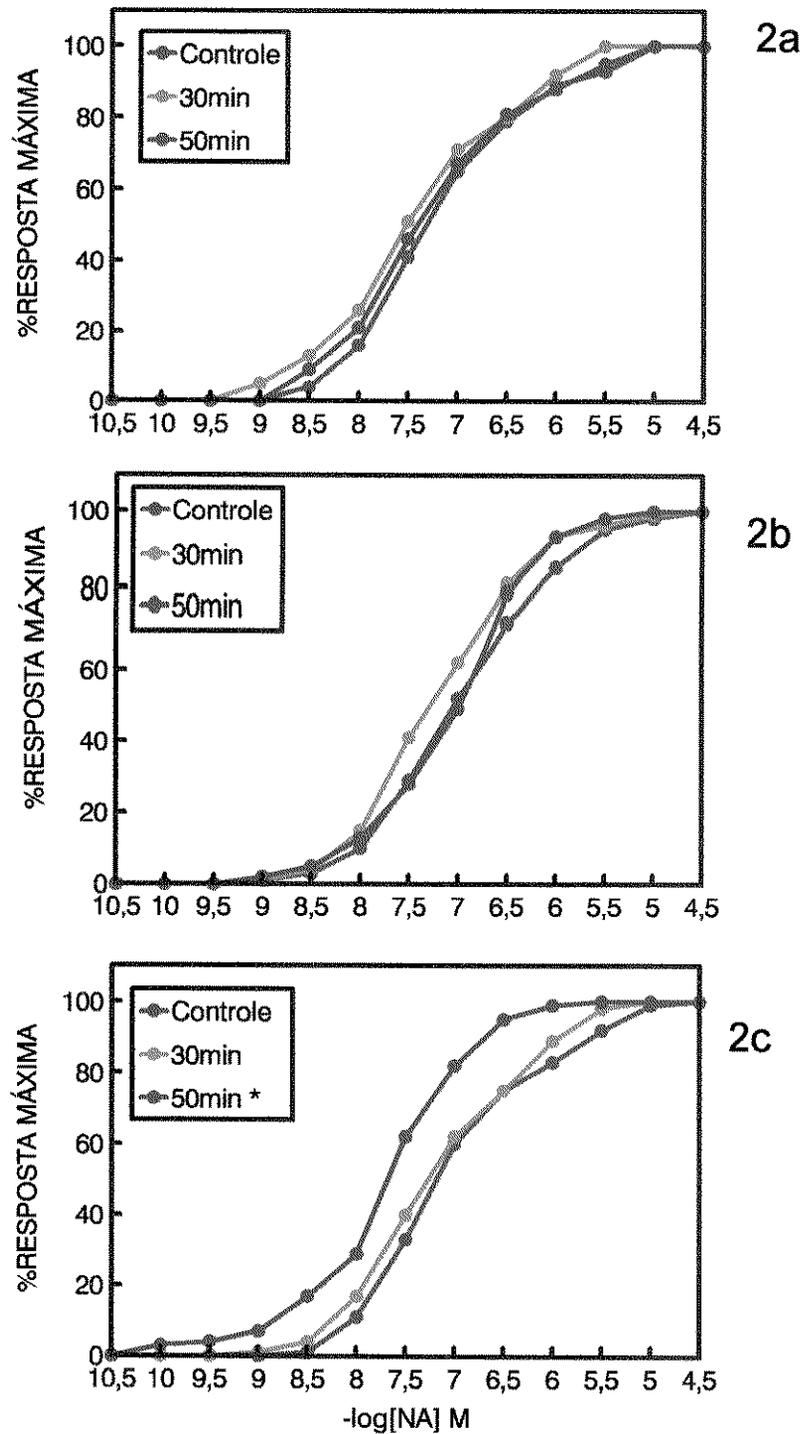


Figura 2 - Curvas dose-resposta à noradrenalina (NA) em átrios direitos isolados de ratos machos (2a), ratas em estro (2b) e ratas em diestro (2c) submetidas a uma sessão de 30 ou de 50 min de natação. * indica diferença estatística em relação ao grupo controle nos valores de pD_2 ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

4.1.4. Sensibilidade à adrenalina

Como está ilustrado na tabela 6, átrios direitos isolados de ratas controles em estro ou diestro apresentaram resposta máxima à adrenalina menor do que aqueles isolados de ratos machos. Ainda comparando animais não submetidos a estresse, o tecido isolado de ratas em diestro apresentou-se supersensível à adrenalina quando comparado aquele de ratas em estro (tabela 5).

Em machos e em fêmeas em estro, o estresse por uma sessão de natação não resultou em alteração de resposta máxima ou de sensibilidade a esta catecolamina (tabela 6 e figuras 3a e 3b).

Entretanto, quando o estresse foi aplicado durante o diestro, houve um aumento da resposta máxima à adrenalina após uma sessão com duração de 30 e de 50 min de natação, em relação ao grupo diestro controle (tabela 6). Foi observado também o desenvolvimento de subsensibilidade à adrenalina em átrios direitos isolados de ratas em diestro submetidas a 50 min de natação. Esta subsensibilidade é caracterizada por um desvio de 3 vezes à direita na curva dose-resposta a este agonista, em relação ao respectivo grupo controle (figura 3c).

Além disso, os valores pD_2 da adrenalina em átrios direitos isolados de ratas submetidas a 50 min de natação durante diestro não diferiram daqueles observados no tecido isolado de ratas em estro controles ou submetidas ao mesmo protocolo experimental (tabela 6).

Tabela 6 - Resposta máxima e pD_2 da adrenalina em átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a uma sessão de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	RM ^b (bat/min)	pD_2 ^c
MACHO	Controle	6	213 ± 09	7,16 ± 0,08
	30min	6	180 ± 14	7,28 ± 0,09
	50min	5	196 ± 08	7,28 ± 0,07
ESTRO	Controle	10	165 ± 10 †	7,01 ± 0,09
	30min	5	190 ± 19	7,02 ± 0,06
	50min	6	168 ± 09	6,80 ± 0,13
DIESTRO	Controle	6	142 ± 09 †	7,38 ± 0,09 ††
	30min	5	196 ± 12*	7,28 ± 0,13
	50min	6	200 ± 10 *	6,82 ± 0,14 *

^a Número de animais. ^b Resposta Máxima (média ± erro padrão). ^c Valores pD_2 (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). † Estatisticamente diferente do grupo macho controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). †† Estatisticamente diferente do grupo estro controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

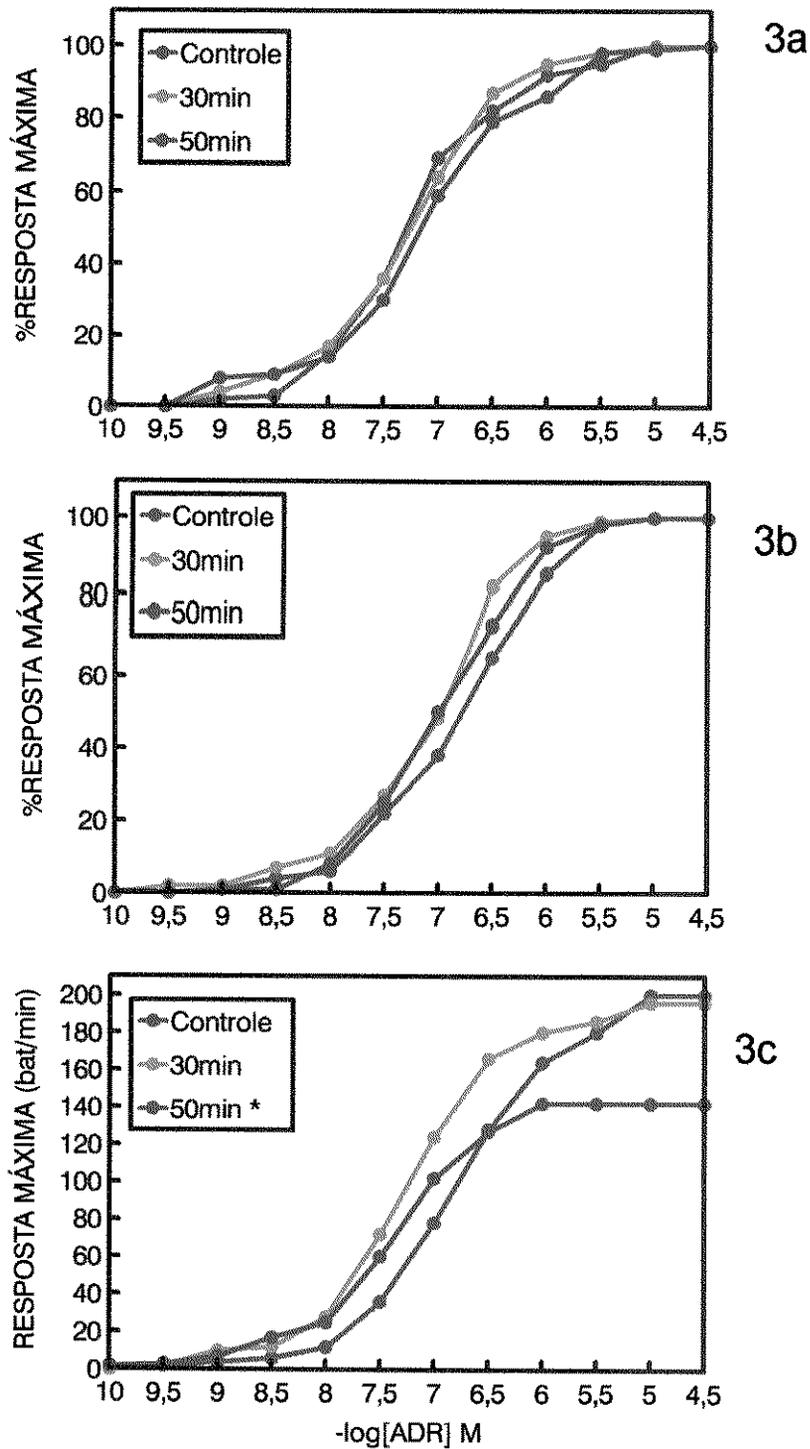


Figura 3 - Curvas dose-resposta à adrenalina (ADR) em átrios direitos isolados de ratos machos (3a), ratas em estro (3b) e ratas em diestro (3c) submetidos a uma sessão de 30 ou de 50 min de natação. * indica diferença estatística em relação ao grupo controle nos valores de pD_2 ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

4.1.5. Concentrações plasmáticas de corticosterona

Na tabela 7 e figura 4 são apresentados as concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos, ratas em estro e em diestro submetidos ao estresse por uma sessão de natação. As concentrações basais deste hormônio não diferiram entre os grupos controles (tabela 7).

A análise dos dados apresentados na tabela 7 e figura 4 permite observar que houve diferença entre machos e fêmeas no padrão de variação das concentrações plasmáticas de corticosterona em resposta a uma sessão de natação. Machos apresentaram aumento de cerca de 3 vezes nas concentrações plasmáticas de corticosterona após uma sessão de 5 ou 15 min de natação, atingindo o pico (cerca de 6 vezes o valor basal) após a sessão de 30 min de estresse, retornando em seguida aos níveis do controle (tabela 7 e figura 4a).

A elevação das concentrações plasmáticas de corticosterona em ratas foi mais rápida do que em ratos. Ratas em estro apresentaram o aumento máximo após a sessão de 5 min de natação (aumento de cerca de 6 vezes em relação ao controle). Esta elevação se manteve após uma sessão de 15 e de 30 min. Ao final de 50 min de natação, as concentrações plasmáticas de corticosterona apresentaram um aumento de cerca de 3 vezes em relação ao controle (tabela 7 e figura 4b).

Ratas em diestro apresentaram uma elevação das concentrações plasmáticas de corticosterona de mesma magnitude (cerca de 5 vezes) após uma sessão de 5, 15 e 30 min de natação. Após a sessão de 50 min, as concentrações deste hormônio permaneceram elevadas (cerca de 3 vezes em relação ao grupo controle), como está indicado na tabela 7 e na figura 4c).

Destaca-se também o fato de que animais submetidos a estresse apresentaram, geralmente, maiores coeficientes de variação em relação aos respectivos grupos controle (tabela 7). O coeficiente de variação indica a variabilidade dos dados em cada grupo analisado.

Tabela 7 - Concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a estresse por uma sessão de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	Corticosterona [µg/100ml] ^b	CV ^c (%)
MACHO				
	Controle	6	13 ± 0,33 A	7
	5min	6	36 ± 5,66 B	39
	15min	6	44 ± 6,68 BC	37
	30min	6	77 ± 7,08 C	22
	50min	6	14 ± 5,20 A	90
ESTRO				
	Controle	6	10 ± 0,48 A	8
	5min	6	64 ± 5,86 B	22
	15min	6	54 ± 5,14 C	23
	30min	5	52 ± 10,32 C	45
	50min	6	33 ± 6,30 C	46
DIESTRO				
	Controle	5	15 ± 1,68 A	29
	5min	6	73 ± 11,81 B	39
	15min	6	76 ± 13,47 B	43
	30min	6	78 ± 13,50 B	42
	50min	5	47 ± 3,14 B	15

^a Número de animais. ^b Valores médios acompanhados dos erros-padrão das médias. ^c Coeficiente de variação (desvio padrão ÷ média). Letras diferentes indicam grupos diferentes estatisticamente (p<0,05; Teste de Tukey). Para a análise estatística, foi realizada transformação logarítmica dos dados, porém os mesmos são apresentados não transformados.

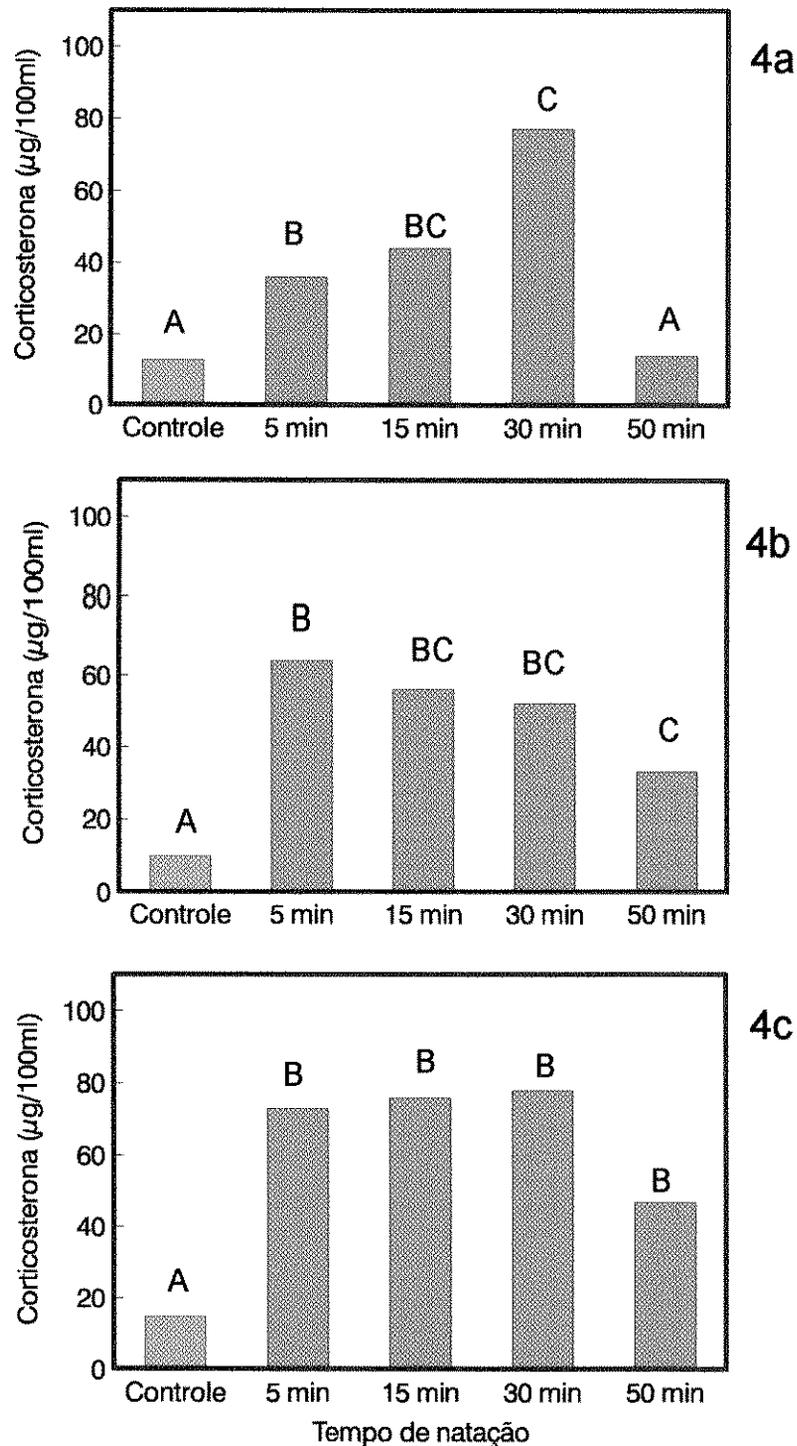


Figura 4 - Concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos machos (4a), ratas em estro (4b) e ratas em diestro (4c) submetidos a uma sessão de 5, 15, 30 ou 50 min de natação. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos ($p < 0,05$; Teste de Tukey). Para a análise estatística, foi realizada transformação logarítmica dos dados, porém os mesmos são apresentados não transformados. Os erros-padrão e o número de animais em cada grupo estão indicados na tabela 7.

4.2. Estresse repetido

Os dados referentes à sensibilidade às catecolaminas dos animais dos grupos controles já foram descritos anteriormente (item 4.1. Estresse único), serão re-utilizados para análise do efeito do estresse repetido.

4.2.1.Frequência inicial

Na tabela 8 são apresentados os valores de frequência inicial de batimentos apresentados por átrios direitos isolados de ratos machos, ratas em estro e em diestro submetidos a três sessões de natação aplicadas em dias consecutivos.

Em resposta ao estresse por três sessões de natação, não houve alteração de frequência inicial em átrios direitos isolados de ratos e de ratas submetidas à primeira sessão durante o diestro e sacrificadas durante o estro (tabela 8).

Entretanto, átrios direitos isolados de ratas submetidas à primeira sessão durante o estro, e sacrificadas no diestro apresentaram diminuição de frequência inicial quando comparados ao grupo controle (tabela 8). A frequência inicial deste grupo de átrios não diferiu daquela apresentada por átrios direitos isolados de ratas em diestro submetidas a uma sessão de 30 min de natação (253 ± 7 bat/min, tabela 3).

Tabela 8 - Frequência inicial de átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a sessões repetidas de natação.

Grupo	Tempo de natação	FI ^a (bat/min)
MACHO	Controle	272 ± 07
	5,15,30 min	248 ± 08
ESTRO	Controle	290 ± 15
	5,15,30 min	272 ± 06
DIESTRO	Controle	285 ± 08
	5,15,30 min	255 ± 08 *

^a Frequência inicial em batimentos por minuto (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste t de Student). O número de animais foi igual a 6 para cada grupo.

4.2.2. Sensibilidade à isoprenalina

Os valores de resposta máxima e pD_2 da isoprenalina de átrios direitos isolados de ratos e ratas submetidos ao estresse repetido são apresentados na tabela 9 e figura 5.

Não houve alteração de resposta máxima ou de sensibilidade à isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos machos e de ratas submetidas a três sessões de natação e sacrificadas durante o estro (figuras 5a e 5b). Entretanto, átrios direitos isolados de ratas submetidas à primeira sessão durante o estro, e sacrificadas no diestro, apresentaram aumento de resposta máxima, sem alteração de sensibilidade a esta catecolamina (tabela 9 e figura 5c).

Tabela 9 - Resposta máxima e valores pD_2 da isoprenalina em átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a sessões repetidas de natação.

Grupo	Tempo de natação	RM ^a (bat/min)	pD_2 ^b
MACHO	Controle	198 ± 07	8,69 ± 0,05
	5,15,30 min	202 ± 15	8,88 ± 0,13
ESTRO	Controle	138 ± 12 †	8,83 ± 0,10
	5,15,30 min	173 ± 12	8,86 ± 0,10
DIESTRO	Controle	170 ± 04	8,74 ± 0,04
	5,15,30 min	212 ± 12 *	8,73 ± 0,09

^a Resposta máxima em batimentos por minuto (média ± erro padrão). ^b Valores pD_2 (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste t de Student). † Estatisticamente diferente dos grupos macho e diestro controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). O número de animais foi igual a 6 em cada grupo.

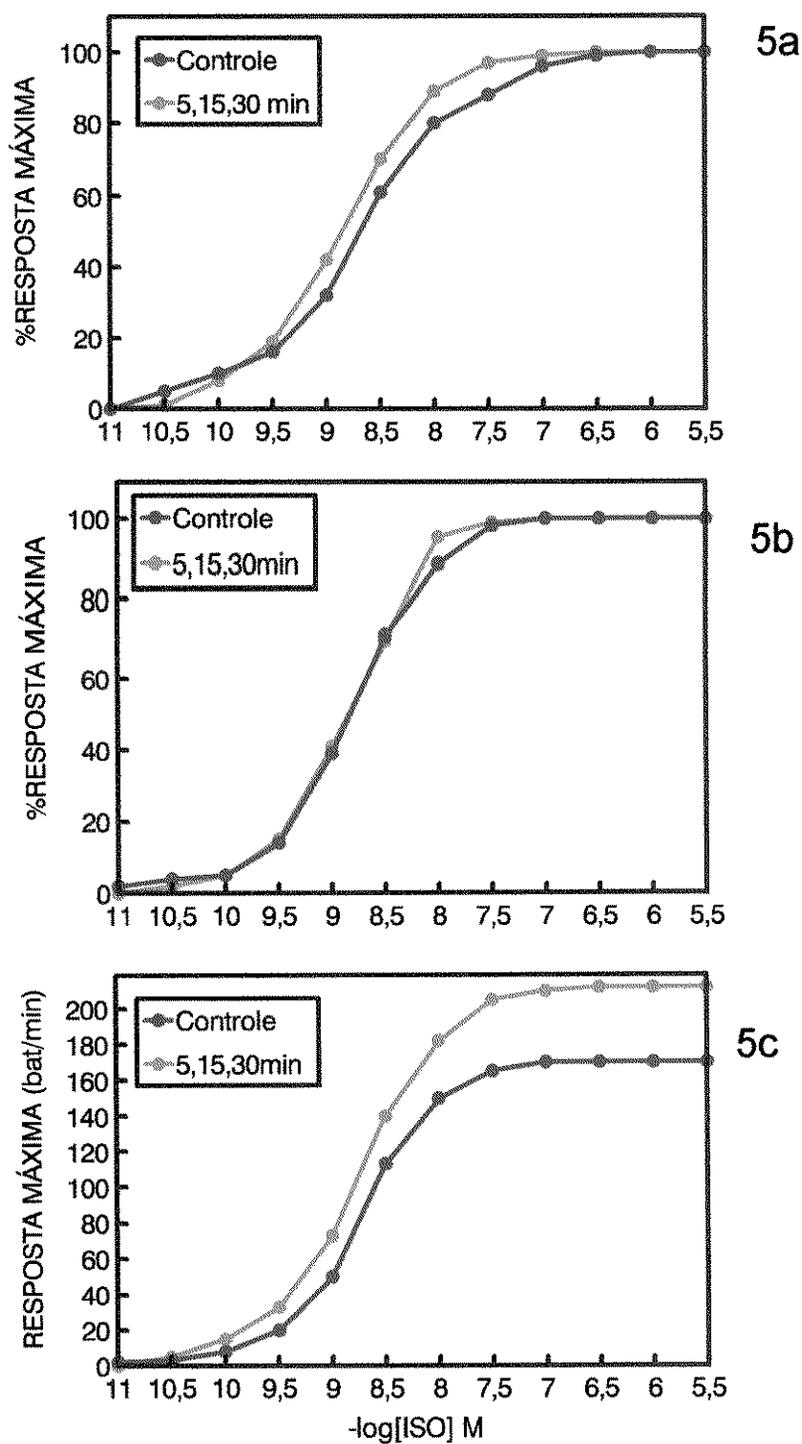


Figura 5 - Curvas dose-resposta à isoprenalina (ISO) em átrios direitos isolados de ratos machos (5a), ratas sacrificadas em estro (5b) e ratas sacrificadas em diestro (5c) submetidos a estresse por sessões repetidas de natação.

4.2.3. Sensibilidade à noradrenalina

Na tabela 10 e figura 6 são apresentados os dados referentes à sensibilidade à noradrenalina de átrios direitos isolados de ratos e ratas submetidos ao estresse repetido.

Átrios direitos isolados de ratos machos e de ratas do grupo estro submetidos ao estresse repetido não apresentaram alterações de resposta máxima ou pD_2 à noradrenalina (figuras 6a e 6b). Entretanto, o tecido isolado de ratas submetidas à primeira sessão de natação durante o estro, e sacrificadas no diestro, apresentou aumento de resposta máxima e subsensibilidade à noradrenalina em relação ao grupo controle (razão = 4,47 vezes, entre os valores pD_2), como está ilustrado na figura 6c.

Não houve diferença entre os valores de pD_2 da noradrenalina obtidos em átrios direitos isolados de ratas em estro controle e aqueles de ratas submetidas a três sessões de natação e sacrificadas no diestro (tabela 10).

Tabela 10 - Resposta máxima e valores pD_2 da noradrenalina em átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a sessões repetidas de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	RM ^b (bat/min)	pD_2 ^b
MACHO	Controle	6	200 ± 07	7,44 ± 0,07
	5,15,30 min	5	200 ± 09	7,21 ± 0,11
ESTRO	Controle	7	176 ± 13	7,01 ± 0,13 ††
	5,15,30 min	6	193 ± 09	7,31 ± 0,06
DIESTRO	Controle	6	152 ± 13 †	7,67 ± 0,11
	5,15,30 min	6	207 ± 10 *	7,03 ± 0,11 *

^a Número de animais. ^b Resposta máxima em batimentos por minuto (média ± erro padrão).

^c Valores pD_2 (média ± erro padrão). * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste t de Student). † Estatisticamente diferente do grupo macho controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). †† Estatisticamente diferente dos grupos macho e diestro controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey).

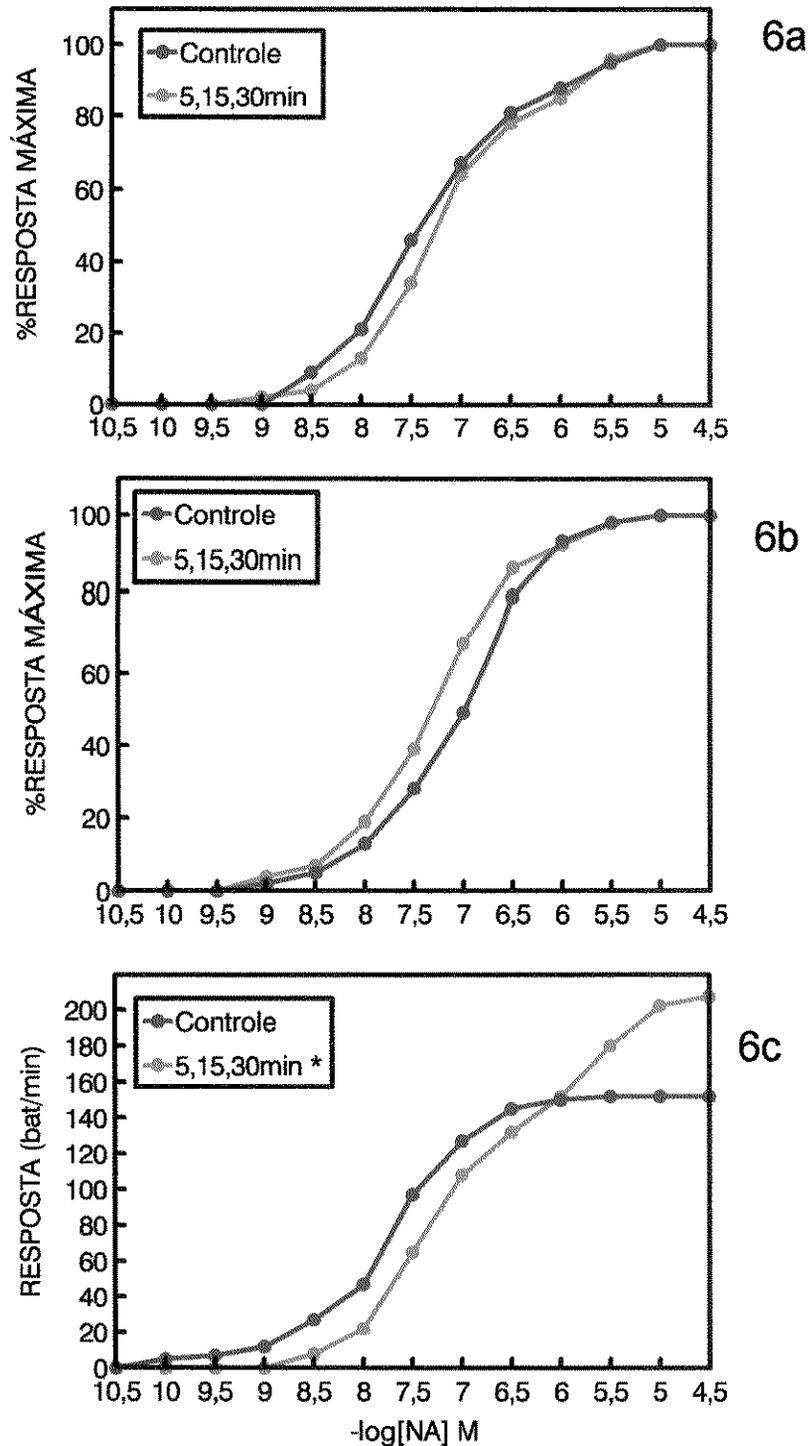


Figura 6 - Curvas dose-resposta à noradrenalina de átrios direitos isolados de ratos machos (6a), ratas sacrificadas em estro (6b) ou em diestro (6c) submetidas a estresse por sessões repetidas de natação. * indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Teste t de Student).

4.2.4. Sensibilidade à adrenalina

Átrios direitos isolados de ratos machos e de ratas do grupo estro submetidos a três sessões de natação não apresentaram alterações de resposta máxima ou pD_2 da adrenalina, como está ilustrado na tabela 11 e figuras 7a e 7b.

Entretanto, átrios direitos isolados de ratas do grupo diestro apresentaram aumento de resposta máxima e subsensibilidade à adrenalina (tabela 11). Esta subsensibilidade caracterizou-se por um desvio de 3 vezes à direita da curva dose-resposta (figura 7).

Não houve diferença entre os valores de pD_2 da adrenalina observados no tecido isolado de ratas em estro controle e aqueles de ratas submetidas a três sessões de natação e sacrificadas no diestro (tabela 11).

Tabela 11 - Resposta máxima e valores pD_2 da adrenalina em átrios direitos isolados de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a sessões repetidas de natação.

Grupo	Tempo de natação	N ^a	RM ^b (bat/min)	pD_2 ^b
MACHO	Controle	6	213 ± 09	7,16 ± 0,08
	5,15,30 min	6	213 ± 10	7,12 ± 0,07
ESTRO	Controle	10	165 ± 10 †	7,01 ± 0,09
	5,15,30 min	9	191 ± 07	7,33 ± 0,18
DIESTRO	Controle	6	142 ± 09 †	7,38 ± 0,09 ††
	5,15,30 min	6	205 ± 17 *	6,90 ± 0,07 *

^a Número de animais. ^b Resposta máxima em batimentos por minuto (média ± erro padrão). ^c Valores pD_2 (média ± erro padrão); * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste t de Student). † Estatisticamente diferente do grupo macho controle ($p < 0,5$; Teste de Tukey). †† Estatisticamente diferente do grupo estro controle ($p < 0,5$; Teste de Tukey).

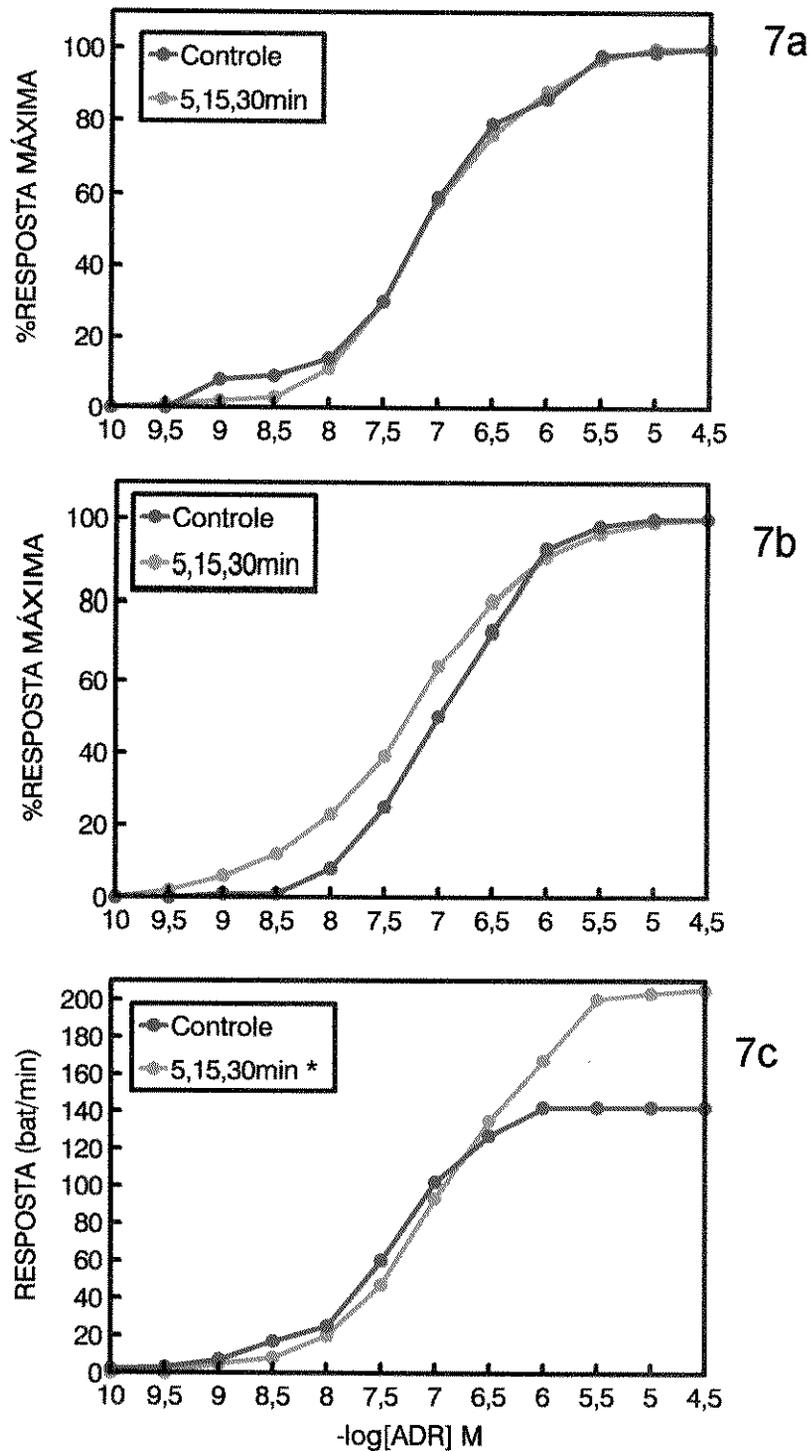


Figura 7 - Curvas dose-resposta à adrenalina de átrios direitos isolados de ratos machos (7a), ratas sacrificadas em estro (7b) e ratas sacrificadas em diestro (7c) submetidas a estresse por sessões repetidas de natação. * indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Teste t de Student).

4.2.5. Concentrações plasmáticas de corticosterona

As concentrações plasmáticas de corticosterona dos animais submetidos a três sessões de natação são apresentadas nas tabelas 12, 13 e 14 e figura 8.

Em ratos machos, as concentrações plasmáticas de corticosterona apresentaram uma elevação de cerca de 3 vezes em relação ao animal controle após a primeira sessão de natação (tabela 12). Após a segunda e terceira sessões o aumento foi de cerca de 5 vezes o valor basal (tabela 12 e figura 8a). Este padrão diferiu daquele observado em ratas em estro ou em diestro submetidas ao mesmo tipo de estresse.

Ratas submetidas à primeira sessão de natação durante o diestro e sacrificadas no estro apresentaram elevação de cerca de 5, 2 e 3 vezes nas concentrações plasmáticas de corticosterona após uma, duas e três sessões de natação, respectivamente (tabela 13 e figura 8b).

Quando as ratas foram submetidas à primeira sessão no estro e sacrificadas no diestro, as concentrações plasmáticas deste hormônio apresentaram elevações de cerca de 6, 4 e 3 vezes após a primeira, a segunda e a terceira sessões, respectivamente (tabela 14 e figura 8c).

Tabela 12 - Concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos submetidos a três sessões de natação.

Grupos	Corticosterona [$\mu\text{g}/100\text{ml}$] ^a
0 min	13 \pm 0,33
5 min	36 \pm 5,66 *
5,15 min	63 \pm 11,10 *
5,15,30 min	60 \pm 9,65 *

^a Valores médios acompanhados dos erros-padrão. O número de animais em cada grupo foi igual a 6. * Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). Para a análise estatística, foi realizada transformação logarítmica dos dados, porém os mesmos são apresentados não transformados.

Tabela 13 - Concentrações plasmáticas de corticosterona ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) de ratas em estro submetidas a estresse por sessões repetidas de natação.

Grupos	Controle ^a	Natação ^a
5 min	15 \pm 1,68 (D)	73 \pm 11,81 (D) *
5, 15 min	46 \pm 1,96 (P)	80 \pm 7,16 (D,P) *
5, 15, 30 min	10 \pm 0,48 (E)	34 \pm 2,34 (D,P,E) *

^a Valores médios acompanhados dos erros-padrão. Entre parênteses é indicada a fase do ciclo estrol: estro (E), metaestro (M), diestro (D), proestro (P). O número de animais em cada grupo foi igual a 6. * Estatisticamente diferente do respectivo grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Tukey). Para a análise estatística, foi realizada transformação logarítmica dos dados, porém os mesmos são apresentados não transformados.

Tabela 14 - Concentrações plasmáticas de corticosterona ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) de ratas em diestro submetidas a três sessões de natação.

Grupos	Controle ^a	Natação ^a
5 min	10 \pm 0,48 (E)	64 \pm 5,86 (E) *
5,15 min	18 \pm 0,76 (M)	70 \pm 9,20 (E,M) *
5,15,30 min	15 \pm 1,68 (D)	40 \pm 8,54 (E,M,D) *

Legenda igual à da Tabela 13.

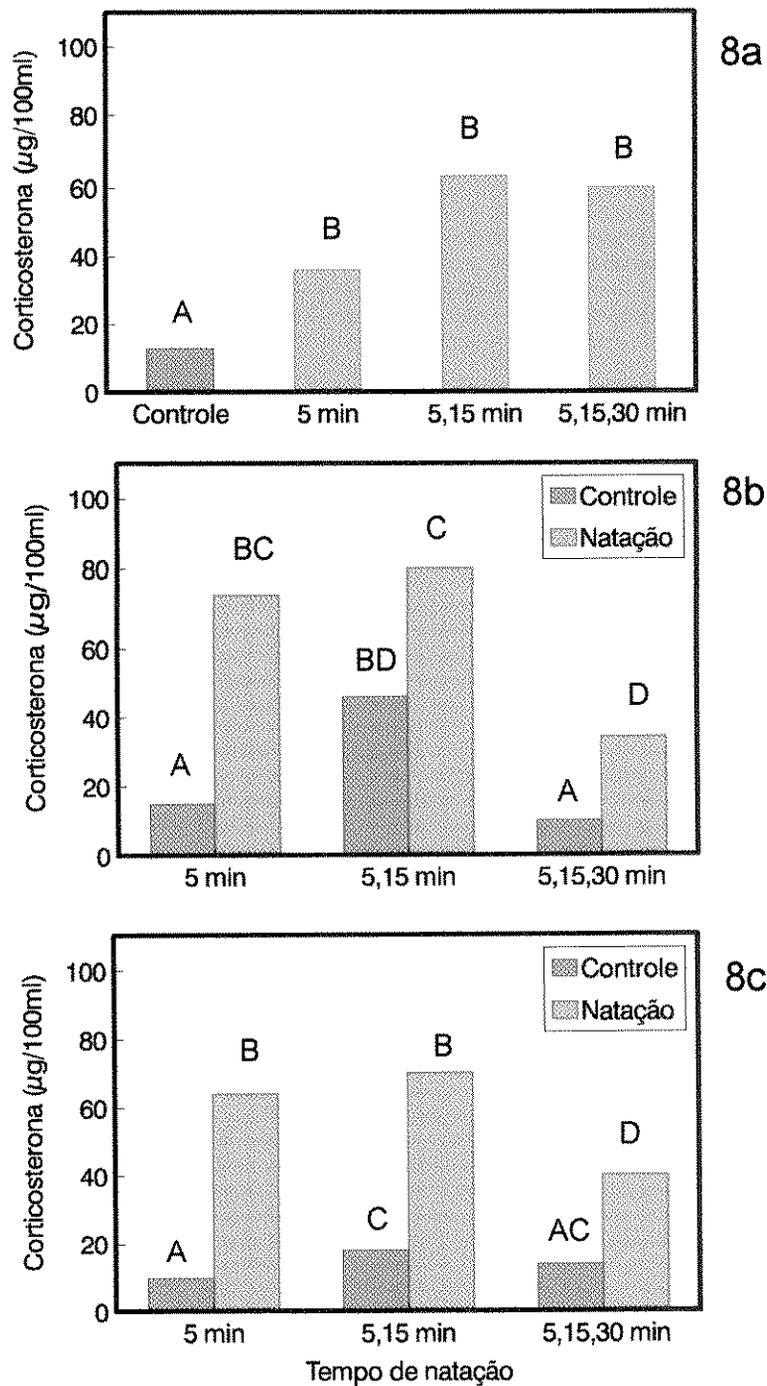


Figura 8 - Concentrações plasmáticas de corticosterona de ratos machos (8a), ratas em estro (8b) e ratas em diestro (8c) submetidos a três sessões de natação. O número de animais em cada grupo foi igual a 6. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; Teste de Tukey). Para realização da análise estatística, os dados sofreram transformação logarítmica, porém são apresentados não transformados. Os erros-padrão estão indicados nas tabelas 12, 13 e 14.

5. DISCUSSÃO

A sobrevivência dos seres vivos é assegurada por sua capacidade adaptativa. Para que um organismo possa se adaptar a uma alteração ambiental ou reagir a um predador, por exemplo, ocorrem inúmeras reações orgânicas para que a sua homeostasia não seja comprometida. Estas alterações fisiológicas constituem a reação de estresse e são desencadeadas pelos mais diferentes estímulos ambientais, físicos, psicológicos ou sociais (SELYE, 1936; GRIFFIN, 1989; CHROUSOS & GOLD, 1992; FRANKS, 1994).

A exposição de um animal a um estímulo desconhecido ou aversivo provoca ativação do sistema nervoso simpático, com maior liberação de catecolaminas, e estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando em aumento da secreção de glicocorticóides. Estas substâncias agem então no organismo a fim de que o mesmo reaja ou fuja do agente estressor. Se a situação se mantém ou se repete, estes mesmos hormônios desencadeiam os processos adaptativos que permitem a convivência com a situação aversiva.

Para o estudo da reação de estresse em ratos de laboratório, diferentes modelos experimentais têm sido utilizados, tais como a imobilização, choques nas patas, barulho ou natação.

A natação, além de representar um agente estressante pelo exercício físico, apresenta um forte componente emocional, relacionado à novidade que este estímulo representa para animal e à impossibilidade de fuga, somada à iminência de morte (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. Depois de alguns minutos seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, o maior tempo possível.

A reação de estresse envolve uma interação de respostas neuro-endócrinas, metabólicas e ajustes circulatórios, que podem incluir alterações de sensibilidade de tecidos periféricos às catecolaminas, como já foi observado em ratos submetidos à imobilização (CAPAZ & DE MORAES, 1988), ao frio (CALLIA, 1981) ou a choques nas patas (BASSANI & DE MORAES, 1986; BENCHIMOL & SPADARI, 1992; VANDERLEI et al., 1995).

Trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório, mostraram que 50 min de natação, em água aquecida a 35°C, determinou o desenvolvimento de supersensibilidade do átrio direito ao efeito cronotrópico da isoprenalina em ratos machos (SPADARI, 1985) e em ratas em diestro, sem alteração no estro (RODRIGUES, 1993). Por outro lado, átrios direitos isolados de ratos machos, submetidos a três sessões de natação, desenvolveram subsensibilidade ao efeito cronotrópico da isoprenalina, noradrenalina e adrenalina (SPADARI, 1985).

No presente trabalho, comparamos a resposta cronotrópica do átrio direito isolado de ratos, ratas em estro e ratas em diestro submetidos a uma ou a três sessões de natação, a 30°C. Nossos resultados mostraram que átrios direitos isolados de ratos machos não apresentaram nenhuma alteração de sensibilidade, em resposta ao estresse por uma ou por três sessões de natação, a 30°C. Átrios direitos isolados de ratas em estro apresentaram subsensibilidade à isoprenalina após uma sessão de natação. E átrios direitos isolados de ratas em diestro submetidas a um sessão de 50 min ou a três sessões de natação desenvolveram subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina.

Estes dados são aparentemente conflitantes com aqueles de SPADARI (1985) e de RODRIGUES (1993). Entretanto, acreditamos que tais diferenças de resposta se devem à temperatura da água em que os animais foram submetidos à natação. Em nosso estudo utilizamos água a 30° C enquanto que nos trabalhos acima citados foi utilizada a temperatura de 35°C. BRUNER & VARGAS (1994) demonstraram que a atividade de ratos durante a sessão de natação varia com a temperatura da água. A movimentação do animal na água parece estar negativamente correlacionada com as chances de sobrevivência. Assim sendo, a diminuição da atividade representaria uma resposta adaptativa. Estes autores observaram que a 29°C a taxa de atividade é menor do que a 35 °C. Desse modo, o nível de estresse poderia ser menor a 29°C do que a 35°C.

Além disso, sendo 37°C a temperatura corporal do rato, a natação a 30°C favoreceria a perda de calor para o meio de maneira mais eficaz, de modo que as exigências fisiológicas para a adaptação seriam menores, dispensando as alterações de sensibilidade relacionadas ao processo adaptativo.

A influência da temperatura da água também se verifica na elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona em resposta ao estresse por natação. Ratos submetidos a uma sessão de 50 min ou a 3 sessões de 5, 15 e 30 min de natação, a 35°C, apresentaram elevação de 3 e 2 vezes respectivamente nas concentrações plasmáticas de corticosterona (SPADARI, 1985). Nós observamos que, após 50 min de natação, a 30°C, os níveis deste hormônio, não diferiram dos níveis basais (figura 4a), e após 3 sessões de natação apresentaram um aumento de 5 vezes em relação ao animal controle (figura 8a).

Em ratas, 50 min de natação a 35°C, induziu um aumento de 2 e de 5 vezes nas concentrações plasmáticas deste hormônio durante o estro e o diestro, respectivamente (RODRIGUES, 1993). Nossos dados mostraram que, a 30°C, os aumentos foram de cerca de 3 vezes durante o estro (figura 4b) e o diestro (figura 4c).

Nossos dados também confirmam que o sexo e o ciclo estral influenciam a sensibilidade às catecolaminas do átrio direito de ratos submetidos à natação, como já havia sido demonstrado em animais submetidos a choques nas patas (BENCHIMOL & SPADARI, 1992; VANDERLEI et al., 1995). Estes autores não observaram alterações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas e sacrificadas no estro. Por outro lado, quando o animal estressado foi sacrificado no diestro, o átrio direito isolado apresentou-se subsensível à

noradrenalina e à adrenalina, como ocorre em ratos machos submetidos ao mesmo estímulo estressor (BASSANI & DE MORAES, 1986, 1987).

Nós observamos que o sexo e a fase do ciclo estral influenciaram não apenas a sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos de ratos submetidos ao estresse, mas também a resposta hormonal, avaliada pelos níveis de corticosterona. Assim, em ratos machos, as maiores concentrações de corticosterona foram observadas após uma sessão de 30 min de natação (figura 4a), enquanto que em fêmeas o pico foi atingido após a sessão de 5 min (figuras 4b e 4c). Fêmeas em estro apresentaram diminuição dos níveis deste hormônio após uma sessão de 15, 30 ou 50 min de natação em relação aos níveis de pico, mas sem retorno aos níveis observados no controle (figura 4b). Entretanto, durante o diestro, as concentrações plasmáticas de corticosterona permaneceram igualmente elevadas após uma sessão de 5, 15 ou 30 min de natação, apresentando pequena queda somente após a sessão de 50 min (figura 4c). Além disso, em resposta ao estresse único, ratas em geral apresentaram maior elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona do que ratos. Estes dados concordam com aqueles de KITAY (1961) e DUPOUY et al. (1987), que demonstraram maiores aumentos nos níveis de corticosterona em ratas do que em ratos submetidos ao mesmo agente estressante.

Em resposta ao estresse repetido, machos apresentaram elevação de mesma magnitude nos níveis de corticosterona após a primeira e a segunda sessões de natação, atingindo o pico na terceira sessão. Em fêmeas, o padrão temporal da secreção de corticosterona em resposta a três sessões de natação foi independente da fase do ciclo estral. O pico foi observado após a primeira sessão, este nível se manteve após a segunda e diminuiu ao final da terceira sessão, porém permaneceram elevados em relação ao controle. Neste caso, o aumento máximo da corticosterona plasmática foi da ordem de 5, 5, e 6 vezes em machos, fêmeas em estro e fêmeas em diestro, respectivamente. Nos machos, o aumento da corticosterona em resposta à natação foi mais lento (figuras 4 e 8) do que em ratas, concordando com dados anteriores obtidos em ratos expostos a um ambiente desconhecido ou ao éter (LESCOAT et al., 1970).

Observamos ainda que em animais submetidos a estresse houve grande variação individual da resposta hormonal. Devido a esta grande variação, não houve homogeneidade das variâncias entre grupos, sendo indicada a transformação logarítmica para análise estatística dos dados. Como foi destacado por GRIFFIN (1989), a percepção que o indivíduo tem do estímulo estressante parece ser o principal fator a influenciar a reação de estresse. Esta percepção depende de características genéticas e de experiências já vivenciadas anteriormente. VOGEL & JENSH (1988) observou também grande variação nos níveis de corticosterona, noradrenalina e adrenalina em ratos submetidos a imobilização, luz ou barulho.

Além disso, em ratos machos e em ratas em diestro submetidos a 50 min de natação a 35°C, as alterações de sensibilidade do marca-passo cardíaco às catecolaminas estão intimamente relacionadas à elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona (SPADARI, 1985; RODRIGUES, 1993).

RODRIGUES (1993) observou que ratas em diestro submetidas a 50 min de natação, a 35°C, apresentaram uma elevação dos níveis de corticosterona de 5 vezes em relação ao grupo controle, e um desvio de 3 vezes à esquerda na curva dose-resposta à isoprenalina no átrio direito isolado. Esta supersensibilidade estava relacionada à ação inibitória da corticosterona sobre o sistema de captação extra-neuronal das catecolaminas. Ratas em estro apresentaram uma elevação de 2 vezes nos níveis de corticosterona em resposta a este agente estressor, mas não desenvolveram alterações de sensibilidade às catecolaminas no tecido cardíaco (RODRIGUES, 1993). Em resposta ao mesmo tratamento, ratos machos apresentaram elevação de 2 vezes nos níveis plasmáticos de corticosterona e um desvio de 30 vezes à esquerda na curva dose-resposta à isoprenalina (SPADARI, 1985). Esta supersensibilidade também era dependente da presença de altos níveis de corticosterona, pois foi anulada pela adrenalectomia ou tratamento com metirapona, que inibe a síntese deste hormônio.

Nossos resultados demonstraram que após 50 min de natação, a 30°C, ratos machos não apresentaram elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação ao controle. Nestas condições átrios direitos isolados de ratos não apresentaram nenhuma alteração de resposta cronotrópica às catecolaminas. No entanto, fêmeas em estro ou em diestro, nas mesmas condições, apresentaram ainda um aumento de 3 vezes nos níveis deste hormônio, acompanhado de subsensibilidade do átrio direito isolado à isoprenalina no estro, e subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina no diestro.

A ausência de alterações de sensibilidade às catecolaminas, em átrios direitos isolados de ratos machos, submetidos a 50 min de natação, nos quais os níveis plasmáticos de corticosterona não diferem daqueles observados em ratos controles, confirmam trabalhos anteriores nos quais foi enfatizado que o aumento da corticosterona plasmática, que ocorre durante o estresse, é necessário para que se desenvolvam alterações de sensibilidade às catecolaminas (SPADARI et al., 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988; NOURANI et al., 1992). Estes dados também mostram que, apesar da elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona observados em ratas serem de mesma magnitude, a resposta do marca-passo isolado às catecolaminas foi diferente.

Após 3 sessões de natação, ratos machos, ratas em estro e ratas em diestro apresentaram um aumento de 5, 3 e 3 vezes, respectivamente, nos níveis plasmáticos de corticosterona (figura 8). Nestas condições, átrios direitos isolados de ratos e de ratas em estro não desenvolveram alterações de sensibilidade às catecolaminas (figuras 5,6, e 7). Entretanto, o tecido isolado de ratas em diestro desenvolveu subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina (figuras 6 e 7). Novamente observamos níveis plasmáticos de corticosterona semelhantes em ratas e diferentes respostas do átrio direito isolado.

Estes dados sugerem que além da corticosterona, outros fatores podem estar influenciando as alterações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a estresse por natação.

Os esteróides sexuais têm sido apontados como capazes de exercer ações diretas sobre a densidade de receptores β -adrenérgicos e ativação dos sistemas de segundos-mensageiros (ROBERTS et al., 1977, 1979; FREGLY et al., 1978; LEVIN et

al., 1980; DAVIES & LEFKOWITZ, 1984, KLANGKALYA et al., 1988) sobre a atividade das enzimas responsáveis pela metabolização das catecolaminas (IVERSEN & SALT, 1970; SAARIKOSKI, 1988; MA et al., 1993), ou ainda por uma ação modulatória sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DUPOUY et al., 1987; BURGESS & HANDA, 1992; HANDA et al., 1994).

Nos átrios e aurículas, há receptores para estradiol (STUMPF & SAR, 1977). Recentemente foi demonstrado que o estradiol aumentou a secreção basal do fator atrial natriurético, enquanto que a testosterona diminuiu a secreção do mesmo em resposta à distensão do tecido, o que confirma que o coração, e mais especificamente o átrio é um órgão alvo dos esteróides gonadais (DENG & KAUFMAN, 1993).

A densidade de receptores β -adrenérgicos uterinos é maior durante o estro e o proestro, sugerindo uma ação regulatória dos esteróides sexuais (KRALL et al., 1978).

Já foi demonstrado também que o estradiol pode alterar a densidade de receptores adrenérgicos em bexiga urinária (LEVIN et al., 1980), útero (ROBERTS et al., 1977) e plaquetas de coelhas (ROBERTS et al., 1979), no útero de cobaias (HATJIS et al., 1988) e no coração de ratas (KLANGKALYA & CHAN, 1988), além de diminuir a sensibilidade do tecido adiposo marrom de ratos ao efeito termogênico da noradrenalina (PUERTA et al., 1993).

Quanto à ação dos esteróides sexuais sobre os sistemas de metabolização das catecolaminas, foi demonstrado que a atividade da COMT e da MAO pode ser modulada pela ação de estrógenos e/ou da progesterona, em diferentes tecidos. Em placenta humana, estradiol e progesterona diminuíram a atividade destas duas enzimas (SAARIKOSKI, 1988). Além disso, a atividade da MAO no ovário, útero e adrenal de ratas, varia ao longo do ciclo estral (ZOLOVICK et al., 1966; HOLZBAUER & YODIM, 1973).

Com relação às ações dos esteróides gonadais sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, BURGESS & HANDA (1992) observaram que em ratas ovariectomizadas, o tratamento com estradiol resulta em maior e mais prolongada elevação dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse por choques nas patas ou por éter. Além disso, ratas apresentaram um aumento maior e mais rápido da corticosterona plasmática do que machos, quando submetidas à imobilização, ao éter ou a um ambiente desconhecido (HALEEM et al., 1988; LESCOAT et al., 1970; KITAY, 1961).

Isto poderia ser resultante de uma maior sensibilidade da hipófise de ratas ao CRH por ação estrogênica (KITAY, 1961; COYNE & KITAY, 1969). Sugeriu-se também que a sensibilidade da adrenal ao ACTH poderia ser maior em ratas do que em ratos, tendo em vista que o dipropionato de estradiol potencializou o efeito do ACTH sobre o peso da glândula adrenal, e que a metil-testosterona apresentou efeito contrário (GOMPERTZ, 1958).

Em estudo recente, HANDA et al. (1994) analisaram os efeitos dos esteróides sexuais na resposta ao estresse, em ratos submetidos a choques nas patas ou expostos a um ambiente desconhecido (campo-aberto). O aumento dos níveis plasmáticos de ACTH

e de corticosterona em resposta aos dois estímulos estressantes foi maior em ratos castrados do que em animais normais. Este efeito foi revertido pela administração de testosterona ou de propionato de dehidrotestosterona. A administração de estrógeno aos animais castrados determinou um aumento dos níveis basais de corticosterona e daqueles observados em resposta ao segundo protocolo de estresse. Os autores concluíram que as diferenças sexuais observadas em resposta ao estresse podem estar relacionadas a um efeito estimulatório do estrógeno em fêmeas, e inibitório da testosterona em machos (HANDA et al., 1994; DUPOUY et al., 1987).

Na hipófise de ratas, a densidade de receptores para glicocorticóides e para mineralocorticóides é menor do que em ratos machos, e está sujeita a regulação por ação estrogênica (TURNER, 1990), o que poderia explicar a reduzida sensibilidade à retroalimentação negativa dos glicocorticóides a nível hipofisário em fêmeas (TURNER, 1990).

Por outro lado, a vida média da corticosterona no plasma de ratas é menor do que aquela de ratos (KITAY, 1961).

Em ratas, ocorre aumento nos níveis plasmáticos de estradiol e de progesterona em resposta à imobilização (MacNIVEN et al., 1992). Em experimentos preliminares, nós verificamos que, em ratas, os níveis plasmáticos de progesterona e de estradiol também parecem ser alterados pela natação. Em resposta a 50 min de natação, ocorre diminuição nos níveis de progesterona durante o estro, sem alteração no diestro. O mesmo estímulo provoca elevação nos níveis de estradiol no estro e uma diminuição no diestro (MARCONDES & SPADARI, 1995). Por outro lado, três sessões de natação resultaram em diminuição dos níveis de progesterona independentemente da fase do ciclo estral. Os níveis de estradiol diminuíram durante o estro, e não se alteraram no diestro (MARCONDES & SPADARI, 1995).

Além da influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a resposta ao estresse em ratos, também verificamos esta influência em animais controles. Observamos que o átrio direito isolado de ratas em estro apresentaram menor resposta máxima à isoprenalina do que aquele isolado de machos e de ratas em diestro (tabela 4). Átrios direitos isolados de ratas em diestro apresentaram menor resposta máxima à noradrenalina do que aquele isolado de machos (tabela 5). Observou-se também menor resposta máxima à adrenalina em átrios direitos isolados de ratas em estro e em diestro em relação a machos (tabela 6). Além destas diferenças de resposta máxima, átrios direitos isolados de fêmeas em estro apresentaram-se subsensíveis à noradrenalina quando comparados ao tecido isolado de machos e de fêmeas em diestro (tabela 5). E, em fêmeas, a sensibilidade do tecido isolado à adrenalina foi maior durante o diestro em relação ao estro (tabela 6).

Com relação ao ciclo estral, o átrio direito isolado de ratas em estro, apresentou subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina em relação ao tecido isolado de ratas em diestro. RODRIGUES et al. (1995) observaram que a sensibilidade do marca-passo cardíaco à adrenalina varia ao longo do ciclo estral aumentando na seguinte ordem: estro \leq metaestro \leq diestro \leq proestro. Esta variação cíclica da sensibilidade do

marca-passo à adrenalina estaria relacionada à inibição da captação extraneuronal desta catecolamina pela corticosterona, cujos níveis seguem o mesmo padrão de oscilação ao longo do ciclo estral.

Apesar de não haver diferença entre os níveis basais de corticosterona quando se comparam machos, ratas em estro e em diestro, a alteração cíclica dos níveis de corticosterona ao longo do ciclo estral em ratas está amplamente documentada (RAPS et al., 1971; PHYLLIPS & POOLSANGUAN, 1978; BARON & BRUSH, 1979; RODRIGUES et al., 1995). Além disso, os níveis de progesterona e de estradiol são maiores em fêmeas e também variam ao longo do ciclo reprodutivo (FREEMAN, 1988).

Concluindo, os resultados por nós obtidos demonstram que a reação de estresse em ratos sofre grande influência do sexo e das fases do ciclo reprodutivo, bem como da intensidade e frequência de apresentação do estímulo estressante. Acreditamos que tais influências se devem a uma interação entre os níveis de corticosterona e de esteróides sexuais. É nosso próximo objetivo analisar os mecanismos responsáveis pelas alterações de sensibilidade adrenérgica aqui relatadas e a influência exercida pelo estradiol e pela progesterona neste fenômeno.

6. CONCLUSÕES

1. Átrios direitos isolados de ratos machos submetidos a uma sessão de 30 ou 50 min de natação, ou a três sessões (5, 15, 30 min), aplicadas em dias consecutivos, não apresentam alteração de sensibilidade às catecolaminas, quando a temperatura da água é de 30°C .
2. Átrios direitos isolados de ratas submetidas a uma sessão de 30 min de natação, a 30°C, durante o estro ou o diestro, não apresentam alteração de sensibilidade às catecolaminas.
3. Átrios direitos isolados de ratas submetidas a uma sessão de 50 min de natação, a 30°C, desenvolveram subsensibilidade à isoprenalina no estro, e subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina no diestro.
4. Átrios direitos isolados de ratas sacrificadas no estro, após três sessões de natação (5, 15, 30 min) a 30°C, não apresentaram alteração de sensibilidade às catecolaminas. Quando o animal estressado foi sacrificado no diestro, o tecido desenvolveu subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina.
5. O sexo e o ciclo estral influenciaram o padrão temporal de variação dos níveis plasmáticos de corticosterona em resposta ao estresse.
6. Aumentos significativos nos níveis plasmáticos de corticosterona são necessários porém não suficientes, para que se desenvolvam alterações de sensibilidade do átrio direito isolado de ratas submetidas a estresse.
7. As alterações de sensibilidade do átrio direito isolado de ratos, ratas em estro ou em diestro submetidos à natação, a 30°C, não apresentaram relação direta com as variações dos níveis plasmáticos de corticosterona e sofreram importante influência do sexo e das fases do ciclo reprodutivo.
8. Há grande variação individual na elevação da concentração plasmática de corticosterona em ratos machos e fêmeas, submetidos a uma ou a três sessões de natação a 30°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELL, C.W. Monoamine oxidase A and B from human liver and brain. **Methods in Enzimology**, **142**: 638-650, 1987.
- AHLQUIST, R.P. A study of the adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.**, **153**:586-600, 1948.
- ANISHCHENKO, T.G. & GUDKOVA, E.V. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenalin. **Bull. Exp. Biol. Med.**, **113**(6): 769-771, 1992.
- AXELROD, J. & REISINE, T. D. Stress Hormones: Their interaction and regulation. **Science**, **224**(4648):452-459, 1984.
- BÁNKY, Z.; NAGY,G.M. & HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. **Neuroendocrinology**, **59**: 63-71, 1994.
- BARON, S. & BRUSH, R. Effects of acute and chronic restraint and oestrus cycle on pituitary-adrenal function in the rat. **Horm. Behav.**, **12**:218-224, 1979 .
- BASSANI, R. A. & DE MORAES, S. Variações de sensibilidade a catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a choque na pata. I Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, São Paulo. **Anais**, p. 299, 1986.
- BASSANI, R. A. & DE MORAES, S. Subsensitivity to beta adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock stressed rats. **Gen. Pharmacol.**, **18**:473-477, 1987.
- BENCHIMOL, L. L. & SPADARI, R.C. Influência das fases do ciclo estral sobre a sensibilidade às catecolaminas do átrio direito de ratas submetidas a choque nas patas. VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, agosto. **Anais**, p. 180, 1992.
- BÖNISCH, H. Extraneuronal transport of catecolamines. **Pharmacology**, **21**: 93-108, 1980.
- BÖNISCH, H.; GRAEFE, K.H. & TRENDELENBURG, U. The determination of the rate constant for the efflux of an amine from efflux curves for amine and metabolite. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **304**: 147-155, 1978.
- BOX, G.E. P.; HUNTER, W.G. & HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. John Wiley & Sons ed., EUA, 1978.

- BROWN-GRANT, K; EXLEY, D. & NAFTOLIN, F. Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat. **J. Endocr.**, **48** (2); 295-296, 1970.
- BRUNER, C.A. & VARGAS, I. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. **Physiol. Behav.**, **55**: 21-28, 1994.
- BURGESS, L.H. & HANDA, R.J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. **Endocrinology**, **131**(3): 1261-1269, 1992.
- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W.E. & FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, **94**: 1704-1708, 1974.
- BYLUND, D.B.; EIKENBERG, D.C.; HIEBLE, J.P.; LANGER, S.Z.; LEFKOWITZ, R.J.; MINNEMAN, K.P.; MOLINOFF, P.B.; RUFFOLO, R.R. & TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors **Pharmac. Rev.**, **46** (2): 121-136, 1994.
- CALLIA, M. L. **Supersensibilidade de adrenoceptores β_1 cardíacos e níveis plasmáticos de corticosterona em ratos expostos ao frio.** São Paulo. Dissertação de mestrado. Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. 62pp., 1981.
- CALLIA, M. L. & DE MORAES, S. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **230**: 450-454, 1984.
- CANNON, W.B.; QUERIDO, S.; BRITTON, S.W. & BRIGHT, E.M. Studies on the conditions of activity in endocrine glands. The role of adrenal excretion in the chemical control of body temperature. **Am. J. Physiol.**, **79**: 466-506, 1927.
- CAPAZ, F.R. & DE MORAES, S. Reduction by acute restraint stress of norepinephrine sensitivity in the isolated rat pacemaker. **Eur. J. Pharmacol.**, **147** 295-298, 1988.
- CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. **JAMA**, **267** (9): 1244-1252, 1992.
- CONDON, T. P.; RONNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. Estrogen modulation of the α -1 adrenergic response of hypothalamic neurons. **Neuroendocrinology**, **50**(1): 51-58, 1989.
- COX, R.H.; HUBBARD, J.W.; LAWLER, J.E.; SNIDERS, B.J. & MITCHELL, V.P. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, **58** (4): 1207-1214, 1985.

- COYNE, M. D. & KITAY, J. I. Effect of ovariectomy on pituitary secretion of ACTH. **Endocrinology**, **85**(6):1097-1102, 1969.
- DAVIES, A. O. & LEFKOWITZ, R. J. Regulation of beta-adrenergic receptors by steroid hormones. **Ann. Rev. Physiol.**, **46**: 119-130, 1984.
- DENG, Y. & KAUFMANN, S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. **Life Sci.**, **53**: 689-696, 1993.
- DRICKAMER, L. C. Determination of oestrous condition in female mice is dependent upon time of day. **J. Reprod. Fert.**, **79**: 659-662, 1987.
- DUPON, C. & KIM, M. H. Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione, and oestradiol during the rat oestrous cycle. **J. Endocr.**, **59** (3): 653-654, 1973.
- DUPOUY, J. P.; HARY, L.; LALAU, J. D.; GRÉGOIRE, I. & CHATELAIN, A. Influence périnatale des hormones sexuelles sur l'activation différentielle de la fonction corticotrope au cours d'un stress chez le mâle et la femelle. **Ann. d'Endocrinol.**, **48**:385-392, 1987.
- EISENFELD, A.; LANDSBERG, L. & AXELROLD, J. Effect of drugs on the accumulation and metabolism of extraneuronal norepinephrine in the rat heart. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, **158** (2): 378-385, 1967.
- EUKER, J.S.; MEITES, J. & RIEGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. **Endocrinology**, **96**: 85-92, 1975.
- FRASER, C.M. & VENTER, J.C. The synthesis of β -adrenergic receptors in cultured human lung cells: induction by glucocorticoids. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, **94** (1): 390-397, 1980.
- FRASER, D.; RITCHIE, J.S.D. & FRASER, A.F. The term "stress" in a veterinary context. **Br. Vet. J.**, **131**: 653-62, 1975.
- FRANKS, B.D. What is stress? **QUEST**, **46**: 1-7, 1994.
- FREEMAN, M. E. **The ovarian cycle of the rat**. In: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil & J. Neil (Ed.) Raven Press, LTD. New York, 1988.
- FREGLY, M.; THRASHER, T.N.; MACARTHUR, S.A. & KELLEHER, D.L. Attenuation of a β -adrenergic response in rats treated chronically with ethynyl estradiol. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **157**: 18-22, 1978.
- FUXE, K.; ANDERSON, K.; ENEROTH, P.; SIEGEL, R. A. & AGNATI, L. F. Immobilization stress-induced changes in discrete hypothalamic catecholamine levels

- and turnover: their modulation by nicotine and relationship to neuroendocrine function. *Acta Physiol. Scand.*, **117**:421-426, 1983.
- GARCIA-MARQUEZ, C.G. & 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.*, **40**: 33-38, 1987.
- GOMPERTZ, D. The effect of sex hormones on the adrenal gland of the male rat. *J. Endocrinol.*, **17**:107-113, 1958.
- GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **20**: 263-312, 1989.
- HALEEM, D.J.; KENNETT, G. & CURZON, G. Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res.*, **458**: 339-347, 1988.
- HANDA, R.J.; NUNLEY, K.M.; STANLEY, A.L.; LOUIE, J.P., McGIVERN, R.F. & BOLLNOW, M.R. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol. Behav.*, **55**: 117-124, 1994.
- HARRI, M. N. E.; MELENDER, L. & TIRRI, R. Changed chronotropic sensitivity to sympathomimetic amines in isolated atria from rats following cold acclimation. *Experientia*, **30**:1041-1043, 1974.
- HASHIMOTO, I; HENRICKS, D.M.; ANDERSON, L. L. & MELAMPY, R. M. Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology*, **82**: 333-341, 1968.
- HATJIS, C. G.; DONALD, R. K. & CREWS, A. Up-regulation of guinea pig myometrial β -adrenoceptors by systemic estradiol and progesterone. *Endocrinology*, **122**: 1455-1459, 1988.
- HENNESSY, M.B.; HEYBACH, J.P.; VERNIKOS, J. & LEVINE, S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol. Behav.*, **22**: 821-825, 1979.
- HERD, J.A. Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, **71** (1): 305-330, 1991.
- HIROSHIGE, T. & WADA-OKADA, S. Diurnal changes of hypothalamic content of corticotropin-releasing activity in female rats at various stages of estrous cycle. *Neuroendocrinology*, **12**: 316-319, 1973.
- HOKFELT, T.; FAHRENKRUG, J.; TATEMOTO, K.; MUTT, V.; WERNER, S.; HULTING, A. L.; TRERENIUS, L. & CHANG, K. J. The PHI (PHI-

- 27)/corticotrophin releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**:895-898, 1983.
- HOLZBAUER, M. & YODIM, M.B.H. The oestrous cycle and monoamine oxidase activity. **Br. J. Pharmac.**, **48** : 600-608, 1973.
- IVERSEN, L.L. & SALT, P.J. Inhibition of catecholamine uptake₂ by steroids in the isolated rat heart. **Br. J. Pharmacol.**, **40**(3): 528-530, 1970.
- KAMEL, F. & KUBAJAK, C. L. Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. **Endocrinology**, **121**:561-568, 1987.
- KANO, T. Effects of estrogen and progesterone on adrenoceptors and cyclic nucleotides in rat uterus. **Japan. J. Pharmacol.**, **32**: 535-549, 1982.
- KANT, G. J.; OUGUY, E. H.; PENNINGTON, L. L. & MEYERHOFF, J. L. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH, corticosterone and prolactin. **Life Sci.**, **33**:2657-2663, 1983.
- KITAY, J. I. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. **Endocrinology**, **68**(5):818-824, 1961.
- KLANKALYA, B. & CHAN, A. The effects of ovarian hormones on beta-adrenergic and muscarinic receptors in rat heart. **Life Sci.**, **42**(23):2307-2314, 1988.
- KONDO, K.; OKUNO, T.; EGUCHI, T.; YASUI, T.; SUZUKI, H.; NAGAHAMA, S. & SARUTA, T. Vascular action of high dose estrogen in rats. **Endocrinol. Japon.**, **27** (3): 307-313, 1980.
- KRALL, J.F.; MORI, H.; TUCK, M.L.; LeSHON, S.L. & KORENMAN, S.G. Demonstration of adrenergic catecholamine receptors in rat myometrium and their regulation by sex steroid hormones. **Life Sci.**, **23** (10): 1073-1082, 1978.
- KRULICH, L.; HEFCO, E.; ILLNER, P. & READ, C.B. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. **Neuroendocrinology**, **16**: 293-311, 1974.
- KUPFER, L. E.; BILEZIDIAN, J. P. & ROBINSON, R. B. Regulation of alpha and beta adrenergic receptors by triiodothyronine in cultured rat myocardial cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **334**: 275-281, 1986.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; Mc AULIFF, J.P.; LUDUENA, F.P. & BROWN, I.B. Differentiation of receptors systems activated by sympatomimetic amines. **Nature**; **241**:597-598, 1967.

- LANDSBERG, L. & YOUNG, J. B. **Catecholamines and the adrenal medulla.** In: Williams textbook of endocrinology. Wilson, J. D. & Foster, D. W. (Ed.), 1992.
- LE MÉVEL, J.; BÉRAUD, G. & MANIEY, J. Activités corticohypophysiotrope et corticotrope chez le rat après une agression psychique: effets du sexe et de la surrénalectomie. **J. Physiol. Paris**, **78**: 179-185, 1982.
- LESCOAT, G., JEGO, P., BERAUD, B. & MANIEY, J. Influence de sexe sur les modalités de reponse de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrenalien aux agressions emotionnelles et somatiques chez le rat. **C. R. Soc. Biol.**, **164**:2106-2113, 1970.
- LEVIN, R. M.; SHOFER, F. S. & WEIN, A. J. Estrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **215**(3):614-618, 1980.
- LONG, J.A. & EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Mem. Univ. Calif.**, **6**: 1-148, 1922.
- MA, Z.Q.; BONDILOTTI, G.P.; OLASMAA, M.; VIOLANI, E.; PATRONE, C. PICOTTI, G.B. & MAGGLIA. Estrogen modulation of catecholamine synthesis and monoamine oxidase activity in the human neuroblastoma cell line SK-ER3. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, **47** (1-6): 207-211, 1993.
- MacNIVEN, E.; de CATANZARO, D. & YOUNGLAI, E.V. Chronic stress increases estrogen and other steroids in inseminated rats. **Physiol. Behav.**, **52**: 159-162, 1992.
- MAGGI, A.; ZUCCHI, I. & PEREZ, J. Progesterone in brain: modulation of β -adrenergic receptor activity. **Pharmacol. Res. Commun.**, **17** (3): 283-291, 1985.
- MALBON, C. C. & HADCOCK, J. R. Evidence that glucocorticoid response elements in the 5'-noncoding region of the hamster β_2 -adrenergic receptor gene are obligate for glucocorticoid regulation of receptor mRNA levels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **145**(2):676-681, 1988.
- MANO, K.; AKBARZADEH, A. & TOWNLEY, R.G. Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. **Life Sciences**, **25**: 1925-1930, 1979.
- MARCONDES, F. K. & SPADARI, R. C. Resposta cronotrópica às catecolaminas em átrios direitos de ratas submetidas à natação. VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, agosto. **Anais**, p. 179, 1992.
- MARCONDES, F. K. & SPADARI, R. C. Influence of the estrous cycle on the hormonal response to stress. III Latin American Symposium on Chronobiology, Carguatatuba, São Paulo, Brasil, maio. **Abstracts**, p.80, 1995.

- MARPLE, D.N.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; BLAKE, W.H. & JUDGE, M.D. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, **35** (3): 576-579, 1972.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, **30**: 576-607, 1968a.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, **30**: 631-653, 1968b.
- MATTINGLY, D. A. A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma. *J. Clin. Pathol.*, **15**: 374-379, 1962.
- MEERSON, F.Z. **Adaptation, stress and prophylaxis**. Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984. 329pp.
- MOAWAD, A.H.; RIVER, L.P. & KILPATRICK, S.J. The effect of estrogen and progesterone on β -adrenergic receptor activity in rabbit lung tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **144**: 608-613, 1982.
- NAFTOLIN, F.; BROWN-GRANT, K. & CORKER, C.S. Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrous cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. *J. Endocr.*, **53**: 17-30, 1972.
- NATELSON, B. H.; OTTENWELLER, J. E.; COOK, J. A.; PITMAN, D.; McCARTY, R. & TAPP, W. N. Effect of Stressor Intensity on Habituation of the Adrenocortical Stress Response. *Physiol. & Behav.*, **43**: 41-46, 1988.
- NEQUIN, L.G.; ALVAREZ, J. & SCHWARTZ, N. B. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biol. Reprod.*, **20**: 659-670, 1979.
- NORRIS, J.S.; BROWN, P.; COHEN, J.; CORNETT, L.E.; KOHLER, P.O.; MacLEOD, S.L.; PPOVICH, K.; ROBEY, R.B.; SIFFORD, M.; SYMS, A. J. & SMITH, R.G. Glucocorticoid induction of β -adrenergic receptors in the DDT₁ MF-2 smooth muscle cell line involves synthesis of new receptor. *Molec. Cell. Biochem.*, **74**: 21-27, 1987.
- NOURANI, F.R.R. SPADRAI, R.C. & DE MORAES, S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen. Pharmac.*, **23** (4): 787-91, 1992.
- 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. (Suppl. 477)*: 1-118, 1979.
- PARÉ, W.P. & REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.*, **54**: 1179-1185, 1993.
- PHYLLIPS, J. G. & POOLSANGUAN, W. A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. *Br. J. Pharmacol.*, **84**:227-235, 1978.
- PICKERING, A.D. The concept of biological stress. In: Stress and fish. Pickering Ed., Academic Press, New York, 1981.
- POLLARD, I.; WHITE, B.; BASSETT, J.R. & CAIRNCROSS, K. D. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrous cycle following unpredictable stress in the rat. *Behav. Biol.*, **14**: 103-108, 1975.
- PUERTA, M.; ABELENDA, M.; NAVA, M.P. & FERNANDEZ, A. Reduced noradrenaline responsiveness of brown adipocytes isolated from estradiol-treated rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **71**: 858-861, 1993.
- RAPS, D.; BARTHE, P. L. & DESULLES, P. A. Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in the female rat. *Experientia*, **27**:339-340, 1971.
- RIEGLE, G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, **11**: 1-10, 1973.
- ROBERTS, J. M.; GOLDFIEN, R. D.; TSUCHIYA, A. M.; GOLDFIEN, A. & INSEL, P.A. Estrogen treatment decreases α -adrenergic binding sites on rabbit platelets. *Endocrinology*, **104** (2): 722-728, 1979.
- ROBERTS, J.M.; INSEL, P.A.; GOLDFIEN, R.D. & GOLDFIEN, A. α -Adrenoceptors but not β -adrenoceptors increase in rabbit uterus with oestrogen. *Nature*, **270**: 624-625, 1977.
- ROBERTS, J. M.; INSEL, P. A. & GOLDFIEN, A. Regulation of myometrial adrenoceptors and adrenergic response by sex steroids. *Mol. Pharmacol.*, **20**:52-58, 1981.
- RODRIGUES, M.L.V. **Sensibilidade às catecolaminas dos átrios direitos de ratas: influência das fases do ciclo estral e do estresse.** Tese de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 74pp., 1993.

- RODRIGUES, M.L.V.; MARCONDES, F.K. & SPADARI-BRATFISCH, R.C. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmac.**, no prelo.
- RODRIGUES, M. L. V.; MOURA, M. J. C. S. & SPADARI, R. C. Níveis plasmáticos de corticosterona em ratas submetidas à natação. VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Caxambu, MG. **Anais**, p. 179, 1992.
- SAARIKOSKI, S. Effect of oestrogens and progesterone on the metabolic inactivation of noradrenaline in human placenta. **Placenta**, **9**: 507-512, 1988.
- SAPOLSKY, R.M. Stress in the wild. *Scientific American*, 106-113, jan. 1990.
- SEGGIE, J. & BROWN, G.M. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in rat, following handling or exposure to novel environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **53**: 629-637, 1975.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, **138**(1):32, 1936.
- SHAIKI, A. A. & SHAIKI, S. A. Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. **Endocrinology**, **96**: 37-44, 1975.
- SHAPIRO, E. Effect of estrogens on the weight and muscarinic cholinergic receptor density of the rabbit bladder and urethra. **J. Urol.**, **135**: 1084-1087, 1986.
- SHORE, P.A. Transport and storage of biogenic amines. **Ann. Rev. Pharmacol.**, **12**: 209-226, 1972.
- SLOTKIN, T.A. & BAREIS, D.I. Uptake of catecholamines by storage vesicles. **Pharmacology**, **21**:109-122, 1980.
- SMITH, E. R.; BOWERS, C. Y. & DAVIDSON, J.M. Circulating levels of plasma gonadotropins in 4 and 5 day cycling rats. **Endocrinology**, **93**:756-758, 1973.
- SPADARI, R. C. **Sensibilidade às catecolaminas no átrio direito isolado de ratos submetidos à natação: o papel da corticosterona.** Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 58 pp., 1985.
- SPADARI, R. C.; BASSANI, R. A. & DE MORAES, S. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. **Gen. Pharmac.**, **19**(1):129-135, 1988.

- SPADARI, R.C. & DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of isolated rat pacemaker to chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. **Gen. Pharmacol.**, **19**(4):553-557, 1988.
- STUMPF, W.E. & SAR, M. The heart: a target organ for estradiol. **Science**, **196** (4287): 319-321, 1977.
- TORRELLAS, A.; GUAZA, C.; BORRELL, J. & BORRELL, S. Adrenal hormones and brain catecholamine responses to morning and afternoon immobilization stress in rats. **Phys. Beh.**, **26**(1):129-133, 1981.
- TRENDELENBURG, U. Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. **Life Sciences**, **22**: 1217-1222, 1978.
- TRENDELENBURG, U. Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. **TIPS**, **12**: 334-337, 1991.
- TRENDELENBURG, U.; DRASKOIZY, P.R.; GRAEFE, K.H. The influence of intraneuronal monoamine oxidase on neuronal net uptake of noradrenaline and on sensitivity to noradrenaline. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.**, **5**: 371-378, 1972.
- TRENDELENBURG, U. & GRAEFE, K. H. Supersensitivity to catecholamines after impairment of extraneuronal uptake or catechol-O-methyl transferase. **Federation Proc.**, **34**: 1971-1974, 1975.
- TURNER, B. B. Sex difference in glucocorticoid binding in rat pituitary is estrogen dependent. **Life Sci.**, **46**:1399-1406, 1990.
- VAN DER KAR, L. D.; RICHARDSON-MORTON, K. & RITTENHOUSE, P. A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. **Methods Achieve Exp Pathol.**, **14**:133-173, 1991.
- VANDERLEI, L.C.M.; MARCONDES, F. K.; VEIGA, M.C.A. & SPADARI, R. C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines in right atria depends on the estrous cycle phase. III Latin American Symposium on Chronobiology, Caraguatatuba, São Paulo, Brasil, maio. Abstracts, p. 105, 1995.
- VIAU, V. & MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, **129**(5):2503-2511, 1991.
- VOGEL, W.H. & JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. **Neurosc. Lett.**, **87**: 183-188, 1988.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 2nd ed. Prentice-Hall International, ed. New Jersey EUA, 1984.

- ZENKER, M. & BERNSTEIN, D. E. The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. **J. Biol. Chem.**, **231**:695-701, 1958.
- ZOLOVICK, A.J.; PEARSE, R.; BOEHLKE, F.W. & ELEFTHERIOU, B.E. Monoamine oxidase activity in various parts of the rat brain during the estrous cycle. **Science**, **154**: 649-650, 1966.

ABSTRACT

We studied the influence of sex and estrous cycle on the response of rats to swimming stress, at 30°C. The sensitivity to catecholamines of isolated right atria and corticosterone plasma levels on male rats and female rats at estrus or diestrus were analysed after one swimming session of 5, 15, 30 or 50 min (single stress) or after three sessions of 5, 15 and 30 min. In female rats, repeated swimming sessions were applied during diestrus, metestrus and estrus (estrus group), or during estrus, metestrus and diestrus (diestrus group).

Dose-response curves to isoprenaline, noradrenaline and adrenaline were obtained in right atria isolated from rats after a 30 min or 50 min session, or after the last swimming session of repeated stress. Blood was withdrawn from the left renal vein under pentobarbital anaesthesia, and corticosterone plasma levels were determined fluorimetrically.

Right atria isolated from male rats submitted to swimming stress at 30°C did not present any alteration on sensitivity to catecholamines. Tissue isolated from rats at estrus exhibited subsensitivity to isoprenaline after a 50 min swimming session. Right atria isolated from rats at diestrus showed subsensitivity to noradrenaline and to adrenaline after a single 50 min swimming session or after repeated stress.

Corticosterone plasma levels of male rats showed an increase after 5, 15 and 30 min of swimming, but not after a 50 min session compared to the control group. In female rats at estrus, corticosterone plasma levels were increased in all experimental groups. However the variation profile was different comparing male with female rats. There was a large variation of the hormonal response to swimming stress within each group.

After repeated stress, corticosterone plasma levels of male and female rats increased. However, in the third session, whereas male rats exhibited a higher plasma corticosterone levels, female rats showed lower increase than those observed after the two previous sessions.

Our results demonstrated that sex and estrous cycle have an important influence on the stress response to swimming in rats. Significant increase on corticosterone plasma levels are necessary, but not sufficient, to induce changes on sensitivity to catecholamines. There is also a large individual variation on the hormonal response to swimming stress.