

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Elisângela Farias Silva

**ASPECTOS MOLECULARES, FUNCIONAIS E
COMPORTAMENTAIS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE .**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-Orientadora: Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

**Campinas
2003**

JNIDADE BC
Nº CHAMADA Vitricamp
Si38a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 57568
PROC 16-127-04
C _____ D x
PREÇO 12,00
DATA 15/04/2004
Nº CPD _____

CM00195997-0

Bib id: 314356

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

Si38a

Silva, Elisângela Farias

Aspectos moleculares, funcionais e comportamentais envolvidos nas alterações metabólicas desencadeadas pelo estresse /

Elisângela Farias Silva.--

Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .

Instituto de Biologia.

1. Stress. 2. Glicocorticoides. 3. Tecido adiposo. 4. Catecolamina – Fisiologia --Efeitos psicotrópicos. 5. Ratos. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Grassi-Kassisse, Dora Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

DATA DA DEFESA: 05/12/2003

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch (Orientadora) Regina C

Profª. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira Helena Coutinho Franco de Oliveira

Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira Oduvaldo

Prof. Dr. Rui Curi Rui Curi

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Profª. Dra. Sarah Monte Alegre _____

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas _____

DEDICO e AGRADEÇO

À minha mãe, Esmeralda, pelo seu amor.

À minha irmã, Rosângela, por ensinar sonhar, mesmo com sofrimento...

Ao meu amigo Admar, por me tomar como filha.

Ao meu pai, José, e ao meu sobrinho e irmão, André Luís, sempre vivos na minha memória.

Especialmente

Ao Roberto, pelo apoio e tolerância.

Ao Matheus, um presente de Deus.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pela minha vida.

Agradeço às minhas orientadoras,
Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch e
Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse
pela orientação, paciência, confiança, compreensão,
carinho e amizade em todos os momentos....

AGRADEÇO TAMBÉM

À FAPESP, pelos oito anos de apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas, que colaboraram para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas, meu padrinho, mestre e amigo.

À Profa. Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari, pela orientação e incentivo durante o Programa de Estágio Docente (PED).

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero, à Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira (Depto. de Fisiologia e Biofísica – IB/UNICAMP), à Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo (Depto. de Bioquímica – IB/ UNICAMP) e à Profa. Leonilda M. B. dos Santos (Depto. de Imunologia – IB/ UNICAMP), por permitirem a utilização de seus equipamentos.

Aos colegas do Laboratório de Estudo do Estresse (LABEEST): Alexandre, André, César, Edgar, Elaine, Heder, Iraídes, Juliana, Karina, Kátia, Marília, Márcia, Rafael, Rita, Rodrigo, Sílvia e Valéria por se tornarem parte integrante de uma equipe.

À Marília Mantovani Sampaio-Barros, colaboradora e amiga.

À Fernanda Klein Marcondes pela motivação durante a iniciação científica.

À Maria Esméria Corezola do Amaral e ao Armindo Antônio Alves, por transmitirem seus conhecimentos científicos e técnicos.

Aos funcionários e todos os colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pelos serviços prestados e pelos alegres momentos.

A todos os amigos que, mesmo não sendo citados, participaram direta ou indiretamente na concretização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. A Teoria do Estresse	1
I.2. Mecanismo de Ação dos Hormônios do Estresse	5
I.2.1. Catecolaminas e os adrenoceptores (ARs).....	5
I.2.2. Glicocorticóides e seus receptores	7
I.3. Alterações Metabólicas do Estresse.....	8
I.4. Comportamento Alimentar de Ratos Submetidos ao Estresse	11
I.5. A Contribuição do Laboratório de Estudos do Estresse (LABEEST) para a Compreensão dos Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Reação de Estresse	15
II. OBJETIVOS	19
III. RESULTADOS	20
III.1. <i>Capítulo 1</i>	21
III.1.1. <i>Anexo 1</i>	43
III.2. <i>Capítulo 2</i>	48
III.3. <i>Capítulo 3</i>	58
IV. CONCLUSÕES	75
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
ADP - difosfato de adenosina
AMPc - monofosfato cíclico de adenosina
AR - receptor adrenérgico
ATP - trifosfato de adenosina
CART- transcritores regulados por anfetaminas e cocaína
CCK - colecistoquinina
CRH - hormônio liberador de corticotrofina
DNA- ácido desoxirribonucleico
G-6-P - glicose-6-fosfato
G-6-Pase - glicose-6-fosfatase
GHRH - hormônio liberador do hormônio do crescimento
GLP-1 - peptídeo-1 como o glucagon
GLUT - transportador de glicose
GR - receptor de glicocorticóide
GRE - elemento responsivo aos glicocorticóides
HPA - hipotálamo-pituitária-adrenal (=HHA: hipotálamo-hipófise-adrenal)
i.v.GTT - teste de tolerância à glicose intra venoso
LHS - lipase sensível a hormônio
MAPK - proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCH - hormônio concentrador de melanina
PDE - fosfodiesterase
PDH - piruvato desidrogenase
PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PFK-1 – 6-fosfofruto-quinase -1
PKA - proteína quinase dependente de AMPc
POMC - pró-opiomelanocortina
PVN - núcleo paraventricular
RNA - ácido ribonucleico

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

SNA - sistema nervoso autônomo

SNC - sistema nervoso central

SNS - sistema nervoso simpático

TNF - fator de necrose tumoral

TRH - hormônio liberador de tireotrofina

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa

ÍNDICE DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. Neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos.....12

Tabela 2. Efeitos da leptina em diferentes órgãos e tecidos.....13

Capítulo 1

Table 1. Insulin release stimulated by 5.6 mmol glucose/L (basal) and 16.2 mmol glucose/L (maximal secretion), and the glucose EC₅₀ in pancreatic islets isolated from control and stressed rats.....31

Table 2. Basal and maximal lipolysis induced by norepinephrine (100 µM) in the absence and presence of 500 µU of insulin /ml.....31

Capítulo 3

Table 1.. Leptin and insulin serum levels of fed, fast and fast-refeed control and stressed rats.....64

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figure 1. Glucose tolerance test (*iv*GTT) and plasma insulin levels before and after an *i.v.* injection of a glucose solution in control and foot shock stressed rats.....32

Figure 2. Concentration-response curves to glucose in pancreatic islets isolated from control and foot shock stressed rats sacrificed after the third foot shock session.....33

Figure 3. Antilipolytic action of insulin on the glycerol release stimulated by 100 μ M norepinephrine in adipocytes isolated from control and foot shock stressed rats.....34

Capítulo 1-Anexo I

Figura 1. Concentração plasmática de lactato (mmol/L) de ratos controle e de ratos submetidos a três sessões de estresse por choque nas patas.....47

Capítulo 2

Figure 1. Representative Western blots of GR (A) and β_1 -AR (B), β_2 -AR (C) and β_3 -AR (D) in epididymal adipose tissue from control (co) and stressed (st) rats.....53

Capítulo 3

Figure 1. Body weight, daily food intake, serum leptin and insulin levels of control (CO) and foot shock stressed (ST) rats.....65

Figure 2. Serum leptin and insulin levels (ng/ml) of fasted control (FCO) and foot shock stressed (FST) rats.....66

Figure 3. Effect of BRL 37,344 (30 nmol/ml, *i.p.*) on food intake, serum leptin and insulin levels of control (CO) and foot shock stressed (ST) overnight fasted rats, after six hours of refeeding.....67

RESUMO

Ratos submetidos ao estresse por choque nas patas apresentam aumento na concentração sérica de corticosterona e de glicose. Adipócitos isolados destes animais apresentam aumento da lipólise basal, supersensibilidade à isoprenalina e à adrenalina e subsensibilidade à noradrenalina e ao BRL37344. O objetivo deste trabalho foi verificar quais fatores estariam promovendo as alterações de sensibilidade às catecolaminas em tecido adiposo epididimal de ratos submetidos a três sessões de choque nas patas. Para isso, realizamos i.v.GTT, verificando as concentrações plasmáticas de glicose e de insulina, analisamos a sensibilidade das células adiposas à insulina e das ilhotas pancreáticas isoladas à glicose, além de quantificar os estoques hepático e muscular de glicogênio. Também realizamos ensaios de Western blotting para quantificar os subtipos de receptores β -adrenérgicos e os receptores de glicocorticóides em tecido adiposo epididimal. Considerando que ratos submetidos ao estresse por choque nas patas perdem peso, verificamos se essa alteração seria causada pelo aumento da lipólise, diminuição da ingestão alimentar ou por ambos. Assim, observamos o comportamento alimentar desses animais e a concentração sérica de leptina. Nossos resultados mostram que no i.v. GTT houve aumento da área sob a curva da glicose, bem como hiperglicemia e hiperinsulinemia de jejum em ratos estressados. Estes também apresentaram depleção dos estoques de glicogênio do músculo sóleo e diminuição da sensibilidade das células adiposas à insulina, sem alteração da sensibilidade das ilhotas pancreáticas à glicose.

Em tecido adiposo epididimal de ratos ocorreu aumento do subtipo β_2 e diminuição dos subtipos β_1 e β_3 de adrenoreceptores e dos receptores de glicocorticóides. Ratos submetidos ao estresse por choque nas patas apresentaram menor ingestão alimentar e, em jejum, aumento na concentração sérica de leptina. Concluimos que as alterações de sensibilidade às catecolaminas, observadas anteriormente no tecido adiposo de ratos, refletem as modificações na quantidade total de receptores β -adrenérgicos e de glicocorticóides. Além disso, estes animais apresentam alterações metabólicas, envolvendo diminuição da sensibilidade à insulina e anorexia, o que credencia este modelo experimental para o estudo de algumas desordens metabólicas, servindo como modelo de estudo para algumas patologias desencadeadas pelo estresse.

ABSTRACT

Rats submitted to foot shock stress show increasing plasma corticosterone and glucose levels. In adipocytes isolated from epididymal adipose tissue from stressed rats occur increasing on the basal lipolysis, on the sensitivity to isoprenaline and to epinephrine, and decreasing on the sensitivity to norepinephrine and to BRL37344. Thus, the aim of this thesis was to verify the factors involved on the catecholamines sensitivity modifications in isolated adipocytes from stressed rats. We realized *i.v.* GTT, verifying the glucose and insulin plasma levels, the insulin secretion by isolated pancreatic islets, the insulin sensitivity of white adipocytes, the glycogen stores in the liver and soleus muscle of rats. To verify if the alterations on sensitivity of adipose cells we submitted to epididymal adipose tissue to western blotting analysis to quantify β -adrenergic protein (β -AR) receptors. Considering that plasma corticosterone is increasing in stressed rats and this hormone may be modulate β -ARs, we also quantified glucocorticoid receptors (GR). Rats submitted to this stress protocol loss weight, we available if this effect was result of decreasing on food intake or of increasing on lipolysis, or both. Thus, we observed the ingestive behavior and leptin serum levels in these rats. Our results show that the area under the glucose time course curve was greater in foot shock stressed rats than in control rats, as well as hyperinsulinemia and hyperglycemia at fast. The foot shock stress also promoted depletion on glycogen content of soleus muscle and decrease on sensitivity to insulin in adipocytes, without to modify the sensitivity to glucose by pancreatic islet. In epididymal adipose tissue, foot shock stress caused a decrease in GR, β_1 -AR and β_3 -AR protein levels, but increased β_2 -AR. In rats submitted to foot shock stress occurred decrease on the

ingestive behavior and increase, at fast, on the leptin serum levels. Thus, the foot shock stress triggers off decrease on the ingestive behavior, increase on glucose, insulin and leptin plasma or serum levels, increase on the basal lipolysis, depletion on glycogen stores and decrease on the sensitivity to insulin by adipocytes. Moreover, the results obtained in western blotting analysis confirm and support previous functional studies. Thus, three daily foot shock sessions determine important alterations that may cause metabolic disorders, may therefore provide an useful short-term model of stress-induced disturbances, like insulin subsensitivity and anorexia.

I. INTRODUÇÃO

I.1. A Teoria do Estresse

Homeostasis foi o termo criado por Walter Cannon para descrever processos corporais coordenados com o objetivo de atingir um ponto ideal de equilíbrio (CANNON, 1929; 1939). Sua pesquisa foi pioneira em documentar a função secretora da adrenal em resposta rápida do organismo frente a uma ameaça à homeostasia (CANNON & DE LA PAZ, 1911; CANNON, 1914; CANNON & LISSAK, 1914). Defendendo que a glândula adrenal e o sistema nervoso simpático (SNS) funcionariam como uma unidade, em 1939, aquele autor propôs formalmente que a adrenalina não somente seria o princípio ativo da glândula adrenal como também o neurotransmissor do sistema nervoso simpático (CANNON & LISSAK, 1914). Entretanto, em 1946, Von Euler corretamente identificou a noradrenalina como o neurotransmissor do SNS (VON EULER, 1946). Ainda de acordo com Cannon, a rápida ativação do sistema homeostático - especialmente do “sistema simpatoadrenal” - em situações de emergência poderia preservar o ambiente interno, através de ajustes compensatórios e antecipatórios, aumentando a probabilidade de sobrevivência (GAUTHIER et al. 1972; JULIEN et al., 1990).

Porém, foi Hans Selye quem introduziu e popularizou o estresse com um conceito científico. O início da elaboração de sua “teoria do estresse” foi marcado pela publicação na revista *Nature*, em 1936, que descrevia a tríade patológica (hipertrofia da adrenal, ulceração gastrointestinal e involução do timo^{xvi}), desencadeada por exposição a diversos fatores aversivos ao organismo, posteriormente denominados agentes estressores (SELYE, 1936). Selye definiu o estresse como a resposta não-específica do organismo, enfatizando que a tríade patológica poderia ser desencadeada pela exposição a qualquer estressor, externo ou interno, que ativaria o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), e atribuiu a este eixo a função de efector chave do estresse.

Selye também introduziu o termo “Síndrome Geral de Adaptação”, que se desenvolveria em três estágios sucessivos. O primeiro estágio configura a “reação de alarme”, e representa a resposta inicial do organismo frente a qualquer ameaça. Este ocorreria quando o organismo não estivesse adaptado ao estímulo recebido. Em seguida, sendo mantido o estímulo, ocorreria a fase de resistência, caracterizada pela ativação de

mecanismos adaptativos. Não ocorrendo adaptação, desenvolver-se-ia o estágio de exaustão onde o organismo estaria susceptível a distúrbios patológicos (SELYE, 1936; VAN DE KAR et al., 1991).

Inicialmente, a Síndrome Geral de Adaptação foi descrita como uma reação geral e inespecífica (SELYE, 1936). A continuidade dos estudos sobre a resposta de estresse evidenciou seu caráter específico (MASON, 1968a; MASON, 1968b; KRULICH et al., 1974; HENNESSY et al., 1979; HERD, 1991) e a influência de estressores ambientais (MARPLES, 1972), do sexo (LESCOAT et al., 1970; ANISHCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993), da idade (RIEGLE, 1973) e, principalmente, da percepção individual do agente estressor, o que depende das experiências vividas anteriormente e da novidade ou previsibilidade do estímulo (GRIFFIN, 1989; VOGEL & JENSH, 1998). No entanto, a resposta do SNS estaria ocorrendo não só em situações de ameaça, mas também em atividades não emergenciais do cotidiano, como mudar de postura (LAKE et al., 1976), falar em público (GERRA et al., 2001), fazer uma refeição (PATEL et al., 2002).

Embora todo o sistema nervoso central (SNC) esteja envolvido na manutenção da homeostasia e participe na organização da reação de estresse, algumas áreas apresentam funções específicas nesses mecanismos regulatórios. Os estímulos estressantes podem ativar o SNC através das vias somatossensoriais ou víscero-sensoriais. Os sinais somatossensoriais são detectados por receptores nociceptivos, mecânicos, térmicos ou específicos (como os visuais, os auditivos, os de paladar, e os de equilíbrio) e conduzidos pelos nervos espinais e craniais. Os sinais viscerais são conduzidos ao SNC via transmissão nervosa ou humoral. O processamento dos sinais envolvidos na reação de estresse pode ser classificado em duas categorias de circuitos: curtos e longos. Os circuitos curtos são também denominados resposta espinal do estresse, correspondendo aos reflexos espinais, enquanto que os circuitos longos são conhecidos como resposta supra-espinal do estresse. Estes envolvem centros superiores do SNC, tais como o hipotálamo, o sistema límbico e o córtex cerebral. Cada um deles está conectado com o tronco encefálico e com os centros espino e víscero-sensoriais, e também interagem uns com os outros, uma vez que a manutenção da homeostasia requer coordenação precisa das respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais (revisado por TSIGOS & CHROUSOS, 2002).

Atualmente acredita-se que o sistema efetor do estresse também envolve duas vias principais: neuronal e neuroendócrina. As respostas neuronais são efetuadas através de fibras motoras e autonômicas. A ativação do sistema nervoso autônomo (SNA) determina uma resposta rápida, controlando as funções cardiovascular, respiratória, gastrointestinal, renal, endócrina e outras (TSIGOS & CHROUSOS, 1994). Os neurônios simpáticos pré-ganglionares percorrem todo o cordão espinal do qual se projetam nas regiões torácica e lombar. Os gânglios simpáticos estão localizados próximos ao cordão espinal e destes, neurônios pós-ganglionares inervam vários tecidos, liberando noradrenalina e outros neurotransmissores. A medula da adrenal pode ser considerada como um gânglio simpático especializado, pois embora não seja constituída por nenhum neurônio pós-ganglionar, esta glândula recebe inervação simpática pré-ganglionar e, como resposta, libera hormônios, principalmente adrenalina, na corrente sanguínea.

A via neuroendócrina do sistema efetor do estresse inicia-se nos centros nervosos moduladores (hipotálamo, sistema límbico e córtex cerebral). Estes não emitem eferências diretas para a periferia, mas exercem suas ações através de modulação de neurônios motores e autonômicos nas conexões do tronco encefálico. O hipotálamo tem como via eferente o sistema neurohumoral hipotálamo-hipófise. A ativação hipotalâmica durante o estresse ocorre através da estimulação de neurônios do núcleo paraventricular (PVN). Estes neurônios, que sintetizam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a vasopressina (SAWCHENKO & SWANSON, 1982; PALKOVITS, 1989; PALKOVITS, 1992), representam a origem de uma via final comum para a regulação da liberação, pela adenohipófise, do hormônio adenocorticotrófico (ACTH). O ACTH circulante é o principal regulador da secreção de glicocorticóides pelo córtex da adrenal, sendo estes os efetores finais da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

As catecolaminas podem causar elevação adicional nas concentrações de glicocorticóides, através de adrenoceptores localizados no hipotálamo, os quais estimulam a liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH). Este último causa elevação das concentrações plasmáticas não apenas de ACTH (NOMURA et al., 1981; AL-DAMLUJI, 1988), como também de catecolaminas (BROWN & FISHER, 1984; 1985).

Na reação de estresse, os glicocorticóides operam juntamente com as

catecolaminas (AXELROD & REISINE, 1984). Se o controle corticosteróide é insuficiente, a reação de estresse é mais intensa (HEIM et al., 2000). Alternativamente, se a adaptação ao estresse falha, a concentração de corticosteróides circulantes permanece elevada (SELYE, 1952). Este excesso tem conseqüências catabólicas, levando a quebra de funções vitais (SAPOLSKY et al., 2000).

Além desses, outros eixos neuroendócrinos também podem ser alterados, como os relacionados ao hormônio do crescimento (KRULICH et al., 1974; LUGER et al., 1988), ao hormônio luteinizante (KRULICH et al., 1974; EUKER et al., 1975), ao hormônio folículo-estimulante (KRULICH et al., 1974), à prolactina (EUKER et al., 1975; KANT et al., 1983) e à tireotrofina (MILLS, 1985).

Podemos considerar que os sistemas homeostáticos operam através de mais de um efector, sempre incluindo regulação através de *feedback* negativo. A redundância de efetores com o envolvimento de fatores neuroendócrinos, psicológicos e comportamentais propicia maior controle das variáveis monitoradas e aumenta a probabilidade da adaptação às mudanças específicas da homeostasia, favorecendo sistemas com múltiplos efetores no processo de seleção natural (GOLDSTEIN, 2003).

Porém, os níveis de atividade fisiológica necessários para restabelecer ou manter a homeostasia diferem; e essa diferenciação depende das condições em que o organismo se encontra. Sterling & Eyer (1988) denominaram “alostasia” os níveis de atividade requerida para “manter a estabilidade durante uma mudança”, ou seja, para adaptar. Aos efeitos da ativação de efetores alostáticos, ou seja, dos fatores envolvidos na adaptação por um período intermitente ou contínuo prolongado, McEwen (1998) denominou “carga alostática”. Estes conceitos propostos mais recentemente ampliam a teoria homeostática inicial e podem ajudar a compreender as conseqüências do estresse agudo ou crônico sobre os organismos.

Diante desses novos conceitos, o estresse pode ser redefinido como a reação que é desencadeada quando as expectativas, geneticamente programadas, estabelecidas pelo aprendizado prévio ou deduzidas pelas circunstâncias, não correspondem às percepções

reais ou antecipadas do ambiente externo ou interno. Esta discrepância entre o que é esperado ou programado e o que é observado ou sentido desencadeia respostas compensatórias que constituem a reação de estresse.

1.2. Mecanismo de Ação dos Hormônios do Estresse

1.2.1. Catecolaminas e os adrenoceptores (ARs)

As catecolaminas liberadas exercem sua ação interagindo com sítios específicos de ligação, os adrenoceptores, que foram identificados (AHLQUIST, 1948) e classificados em adrenoceptores α_1 , α_2 (LANGER, 1974), β_1 e β_2 (LANDS et al. 1967a, 1967b), e β_3 (KOBILKA et al., 1987; FRIELLE et al., 1987; EMORINE et al., 1987; 1989). Kaumann e colaboradores sugeriram a existência, em tecido cardíaco, de um novo subtipo de adrenoceptor, o β_4 . Este, uma vez estimulado, teria a capacidade de mediar a cardioestimulação em várias espécies (KAUMANN, 1989; KAUMANN, 1997; KAUMANN & MOLENAAR, 1997). Entretanto, a existência deste subtipo de adrenoceptor não foi comprovada e, atualmente acredita-se que este corresponde a uma isoforma do subtipo β_1 (LOWE et al., 1999, 2002; KAUMANN et al., 2001).

Cada um dos três subtipos de β -adrenoceptores, β_1 , β_2 e β_3 , apresentam especificidades estruturais e funcionais, apesar da natureza protéica comum (BOWEN, 1992). Essas diferenças são dependentes do tecido onde se encontram e do estado funcional orgânico (TAOUI et al., 1987; MAURIÈGE et al., 1987; TAOUI et al., 1989; ARNER et al., 1990; ARNER, 1992; LANGIN et al., 1991; LIEFDE et al., 1992; GALITZKY et al., 1990; GALITZKY et al., 1993; LAFONTAN & BERLAN, 1993). Todos os três subtipos de β -adrenoceptores agem estimulando a adenilil ciclase e, conseqüentemente, aumentando a concentração intracelular de AMPc (BENOVIC et al., 1988). A interação entre os adrenoceptores e a adenilil ciclase é mediada, na maioria dos casos, por uma proteína G estimulatória - G_s (GILMAN, 1987). No entanto, os adrenoceptores β_2 podem se acoplar também à proteína G_i (ABRAMSON et al., 1988; XIAO & LAKATA, 1995). Este acoplamento entre o adrenoceptor β_2 e G_i é favorecido pela fosforilação do receptor por proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) (DAAKA et al., 1997). A proteína G_i , neste caso, ativaria proteínas kinases com atividade mitogênica (MAPK). Classicamente, a proteína G_i desencadeia inibição na atividade da adenilil ciclase. É o que acontece,

por exemplo, quando ocorre ativação α_2 -adrenérgica, determinando diminuição no estado de ativação das proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA) (LANGIN et al., 1996).

A ação das catecolaminas em adipócitos isolados do tecido adiposo branco relacionadas à lipólise ou lipogênese é mediada por quatro subtipos de adrenoreceptores (HOLLENGA & ZAAGSMAN, 1989; LANGIN et al., 1991; CARPÉNÉ et al., 1994; LAFONTAN & BERLAN, 1993), sendo que a importância funcional desses receptores varia de acordo com a espécie, o sexo e a idade do animal, bem como a natureza do depósito de gordura (LAFONTAN & BERLAN, 1993).

A sensibilidade às catecolaminas pode variar em algumas situações fisiológicas, como nas diferentes fases ciclo estral de ratas (VANDERLEI et al., 1996), ou patológicas, como na falência cardíaca (KOCH et al., 2000).

Em adipócitos isolados de ratos submetidos a estresse observa-se alterações de sensibilidade às catecolaminas, com aumento da sensibilidade à adrenalina e à isoprenalina, e diminuição da sensibilidade à noradrenalina e ao BRL37344 (FARIAS-SILVA et al., 1999). Esses resultados sugerem aumento da resposta mediada pelo subtipo β_2 de adrenoreceptor e diminuição da resposta mediada pelo subtipo β_1 . Como o subtipo β_3 de adrenoreceptor é mais resistente à dessensibilização e considerando a não especificidade do agonista BRL37344, não podíamos afirmar se a diminuição da resposta a este fármaco, considerado agonista do subtipo β_3 de adrenoreceptores, era de fato em função de dessensibilização deste receptor ou decorria de sua interação com subtipo β_1 - AR.

Para elucidar esta questão e para verificar os mecanismos envolvidos nas alterações de sensibilidade às catecolaminas em adipócitos de ratos submetidos a estresse por choques nas patas, um dos objetivos foi quantificar, através da técnica de *western blotting*, os adrenoreceptores β_1 , β_2 e β_3 em tecido adiposo epididimal de ratos submetidos ao mesmo protocolo de estresse.

I.2.2. Glicocorticóides e seus receptores

Os glicocorticóides exercem seus efeitos através de receptores citoplasmáticos específicos. (PRATT, 1990; SMITH & TOFT, 1993). Os complexos formados pela interação glicocorticóide-receptor formam homodímeros, os quais translocam-se para o núcleo, onde interagem com elementos de resposta aos glicocorticóides (GRE) situados no DNA. Esta interação pode resultar em ativação de genes sensíveis a estes hormônios (PRATT, 1990). Os receptores ativados também podem interagir com outros fatores reguladores da transcrição gênica, como c-jun/c-fos e NF- κ B, promovendo a transcrição de diversos genes envolvidos na ativação e no crescimento de determinados tipos celulares (SCHEINMAN et al., 1995). Além disso, os glicocorticóides alteram a estabilidade de RNA mensageiros e, portanto, a tradução de várias proteínas responsivas aos glicocorticóides. (FÈVE et al., 1992).

Sapolsky e colaboradores (2000) classificam as ações dos glicocorticóides em duas categorias: modulatórias (que alteram as respostas do organismo ao estressor) e preparatórias (que alteram as respostas do organismo frente à exposição subsequente ao estressor ou levam à adaptação frente à exposição crônica). As ações modulatórias dos glicocorticóides podem ainda ser classificadas em: permissivas, supressivas ou estimulatórias. As ações modulatórias permissivas são aquelas exercidas pelos glicocorticóides presentes antes do estressor e iniciam os mecanismos de defesa da reação de alarme. As ações preparatórias dos glicocorticóides não afetam a resposta imediata ao estressor, mas modulam as respostas do organismo a estressores subsequentes. O aumento na concentração plasmática de glicocorticóides, induzido pelo estressor, desencadeia ações modulatórias supressivas ou estimulatórias. Essas respostas se iniciam uma hora ou mais após a exposição ao estressor, e funcionam como um freio sobre os mecanismos de defesa ativados pelo estresse, protegendo o organismo de um colapso (ações supressivas). Ou aumentam os efeitos da primeira onda de resposta hormonal ao estresse, atuando de maneira oposta às ações supressivas (ações estimulatórias).

Considerando a importante função dos glicocorticóides sobre o metabolismo da célula adiposa e sobre a regulação da expressão dos ARs, também foi objetivo deste trabalho quantificar, através da técnica de *western blotting*, receptores de glicocorticóides em tecido adiposo epididimal de ratos submetidos a estresse por choque nas patas.

I.3. Alterações Metabólicas do Estresse

Dentre as respostas compensatórias que fazem parte da síndrome geral da adaptação estão as alterações metabólicas. A fim de que o organismo tenha o aporte energético necessário para a reação de “luta ou fuga”, os hormônios liberados durante a reação de estresse agem sobre os tecidos de reserva como o adiposo, o muscular e o hepático, modificando o metabolismo de lipídios e de carboidratos, nos quais exercem efeitos opostos aos da insulina (PITTNER et al., 1985a, 1985b; BRINDLEY et al., 1988; LAFONTAN, 2001; RADZIUK & PYE, 2001).

As catecolaminas endógenas, principalmente a adrenalina, estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese hepáticas (HIMMS-HAGEN, 1967; EXTON et al., 1972; HUE et al., 1978; YOREK et al., 1980; KNEER & LARDY, 1983; PILKIS et al., 1988; WATT et al., 2001) disponibilizando glicose para o cérebro em questão de segundos (BRYAN, 1990). Como as catecolaminas não atravessam a barreira hemato-encefálica, este efeito da ativação simpática é imediato, embora indireto, como consequência do aumento do tônus cardiovascular, que resulta em aumento do fluxo sanguíneo cerebral.

Os glicocorticóides influenciam o metabolismo de carboidratos por meio de sua ação permissiva aos efeitos glicogenolíticos e gliconeogênicos das catecolaminas e do glucagon (EXTON et al., 1972). Como resultado destes efeitos ocorre aumento da glicemia (VERAGO et al., 2001; RETANA-MARQUEZ et al., 2003), graças à regulação de diversas enzimas, principalmente da fosfoenolpiruvato quinase (PEPCK), que catalisa a conversão do oxalacetato a fosfoenolpiruvato, e da glicose-6-fosfatase (G-6-Pase), que converte glicose-6-fosfato em glicose (PILKS & GRANNER, 1992). Essa regulação ocorre tanto na transcrição como na estabilidade do RNAm da PEPCK (CRONIGER et al., 1998). Por outro lado, os glicocorticóides podem causar um efeito compensatório no metabolismo de carboidratos durante a resposta de estresse, favorecendo a síntese de glicogênio. Esse efeito seria decorrente da ativação na síntese de glicogênio sintase e da desfosforilação da forma inativa desta enzima, tornando-a ativa (VON HOLT & FIESTER, 1964; STALMANS & LALOUX, 1979; BOLLEN & STALMANS, 1992).

Os glicocorticóides também regulam a glicemia por meio da diminuição da captação de glicose, dependente de insulina, e da utilização de glicose pelos tecidos periféricos. Em adipócitos e fibroblastos, o efeito imediato dos glicocorticóides é a translocação dos transportadores de glicose da membrana plasmática para o interior da célula (CARTER & OKAMOTO, 1987; HORNER et al., 1987). Além disso, glicocorticóides também diminuem os níveis de RNAm do transportador de glicose (GARVEY et al., 1989). De acordo com Saad e colaboradores (1993), ocorrem modificações tanto na interação com os receptores como nas vias de sinalização da insulina em miócitos e hepatócitos de ratos que receberam injeção de glicocorticóides. Macho e colaboradores (1999) observaram que, em músculo de animais submetidos a estresse por restrição de movimentos, ocorreu diminuição da ligação da insulina ao seu receptor, mesmo não havendo aumento na concentração plasmática de insulina. Os autores sugeriram que este processo estaria relacionado a outros fatores regulatórios, incluindo a elevação da concentração plasmática de glicocorticóides.

Em tecido pancreático, as catecolaminas interagem predominantemente com adrenoceptores α , os quais estimulam a liberação de glucagon enquanto inibem a liberação de insulina pelas ilhotas de Langerhans (PORTE JR., 1969; PORTE JR. & ROBERTSON, 1973). A interação de catecolaminas com os adrenoceptores β estimula a liberação de insulina pelas células pancreáticas (YOSHIDA, 1992; ATEF et al., 1996).

Em tecido adiposo branco de ratos, as catecolaminas e o glucagon estimulam a atividade lipolítica, causando liberação de ácidos graxos livres e de glicerol para o plasma. As respostas às catecolaminas, neste tecido, mediadas pela ativação de adrenoceptores β_1 , β_2 e β_3 , promovem a estimulação da lipólise, decorrente do aumento nos níveis de AMPc, ativação de proteína-kinase-dependente de AMPc (PKA) e fosforilação da lipase-hormônio-sensível (HSL) (SLAVIN et al., 1994; LAFONTAN et al., 1995; 2001; 2002). Os glicocorticóides desempenham papel permissivo na manutenção da resposta lipolítica às catecolaminas, na medida em que, *in vitro*, os glicocorticóides aumentam a atividade da HSL (FAIN & GARCÍA-SÁINZ, 1983; SLAVIN et al., 1994).

Aumentos da concentração plasmática de ácidos graxos livres e de glicerol foram observados em cães e em humanos após infusão endovenosa de catecolaminas (CONNOLLY et al., 1991). Galitzky et al. (1993) observaram a elevação de ácidos graxos

livres em plasma de cães, durante a infusão de noradrenalina, adrenalina, isoproterenol, BRL37344 e outros agonistas beta-adrenérgicos. Darimont et al. (1996) demonstraram *in situ*, maior liberação de glicerol pelo tecido adiposo de ratos, após infusão de isoproterenol. Verago et al. (2001) demonstraram *in vivo* que as concentrações plasmáticas de corticosterona em ratos aumentaram significativamente após cada sessão de choque nas patas; as de glicerol não se alteraram; as de triacilgliceróis aumentaram apenas após a 1ª sessão, e as concentrações plasmáticas de glicose aumentaram após as 2ª e 3ª sessões de choque nas patas.

O fígado é o principal órgão captador de glicerol plasmático (LIN, 1977), utilizando-o como substrato para a gliconeogênese e para a síntese de triacilgliceróis (PITTNER et al., 1985a e 1985b; BRINDLEY et al., 1988; NEWGARD et al., 2000).

A síntese hepática de triacilgliceróis a partir de ácidos graxos e de glicerol pode ser modulada pelas catecolaminas, pelo glucagon e pelos próprios ácidos graxos, principalmente através da estimulação da atividade enzimática da fosfatidil fosfolipase (PAULETTO et al., 1991; PITTNER et al., 1985a e 1985b; BRINDLEY et al., 1988). Em hepatócitos, tanto a síntese, quanto a atividade desta enzima, são estimuladas por glicocorticóides (KNOX et al., 1979; PITTNER et al., 1985a e 1985 b; BRINDLEY et al., 1988).

Os triacilgliceróis, em células hepáticas, podem ser incorporados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e liberados para o plasma sangüíneo (PITTNER et al., 1985a e 1985 b; BRINDLEY et al., 1988). A velocidade desta liberação é dependente do fluxo sangüíneo no leito vascular hepático, e este também pode ser influenciado pela ação adrenérgica sobre os vasos (GARDEMANN et al., 1991; YAMAUCHI et al., 1998). Dexametasona estimula a secreção de VLDL em hepatócitos de ratos mantidos em cultura (MANGIAPANE & BRINDLEY, 1986).

A concentração plasmática de triacilgliceróis também é dependente da velocidade de captação, mediada pela atividade da lipoproteína lipase em tecido adiposo, muscular e cardíaco. Vários hormônios influenciam a atividade da lipoproteína lipase, incluindo a insulina, as catecolaminas e os glicocorticóides. Estes hormônios podem estimular ou inibir sua atividade, de acordo com o tecido em que agem (ASHBY & ROBINSON, 1980; HULSMANN & DUBELAAR, 1986; DESHAIES et al., 1993; MORA-RODRIGUEZ & COYLE, 2000).

Em situações em que ocorre elevação da concentração plasmática de catecolaminas e de glicocorticóides, como ocorre durante o estresse, espera-se um aumento do *turnover* dos elementos lipídicos do metabolismo, que pode ser acompanhado ou não da elevação de suas concentrações plasmáticas.

Considerando as ações dos hormônios do estresse sobre o metabolismo, também foi objetivo deste trabalho avaliar a tolerância à glicose através do *i.v.* GTT, a sensibilidade dos adipócitos isolados à insulina, a sensibilidade das ilhotas pancreáticas isoladas à glicose, a concentração de insulina e os estoques de glicogênio hepático e muscular em ratos submetidos a três sessões de choque nas patas.

1.4. Comportamento Alimentar de Ratos Submetidos ao Estresse

Nós observamos que ratos submetidos ao estresse por choque nas patas apresentam diminuição no peso corporal (FARIAS-SILVA et al., 1999). No entanto, não sabíamos se esta perda de massa corpórea total seria resultado de aumento da lipólise basal, diminuição da ingestão alimentar, ou ambos.

A ingestão alimentar fornece ao organismo o aporte calórico necessário, juntamente com micronutrientes (vitaminas e sais minerais) e macronutrientes (carboidratos, gorduras e proteínas), para realizar as funções orgânicas. O comportamento alimentar trata-se de um comportamento complexo com vários níveis de controle (HALFORD & BLUNDELL, 2000; SCHWARTZ et al., 2000; WOODS et al., 2000), dentre os quais se destaca o controle hipotalâmico.

A função do hipotálamo na regulação do apetite e no balanço energético foi estabelecida através de lesões do hipotálamo lateral, que desencadeavam afagia profunda e perda de peso, e do hipotálamo ventromedial, que resultavam em hiperfagia e obesidade (OOMURA, 1980; revisado por BERNARDIS & BELLINGER, 1996). Baseando-se nestas observações, Stellar (1954) propôs a “teoria do centro duplo”, preconizando que a atividade do hipotálamo lateral, denominado “centro da fome”, seria controlada por vias inibitórias do hipotálamo ventromedial, “centro da saciedade”. Embora esta simples e elegante teoria tenha sofrido muitas mudanças no decorrer de mais de 50 anos, incluindo a incorporação de diversos e importantes núcleos hipotalâmicos (núcleo paraventricular,

núcleo arqueado,

núcleo dorsomedial, núcleo supraquiasmático), bem como as alças de *feedback* negativo, foi somente nos últimos 10 anos que ocorreram avanços significativos na elucidação das vias envolvidas e nos sinais biológicos chaves (KALRA et al., 1999; BECK, 2000; MERCER & SPEAKMAN, 2001). Estes trabalhos, além de identificar muitos neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos, também forneceram suporte à hipótese de que circuitos neuronais distintos operam localmente, no hipotálamo, na regulação da ingestão alimentar e na homeostasia energética (revisado por RODGERS et al., 2002). A Tabela 1 apresenta uma lista destes neuropeptídeos.

Tabela 1. Neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos (Adaptado de INUI, 1999; KALRA et al., 1999; AHIMA & OSEI, 2001;).

Peptídeos orexígenos (↑ ingestão alimentar)	Peptídeos anorexígenos (↓ ingestão alimentar)
• AgRP • Opióides endógenos • Galanina • Grelina • GHRH • MCH • NPY • Orexina A	• α-MSH • CCK • CART • CRH • GLP-1 • Melanocortina • Neurotensina • TRH • Urocortina

Os neuropeptídeos hipotalâmicos são os principais candidatos a efetores da sinalização de *feedback* negativo da adiposidade, que é representada pela leptina. Esta, que é produto do gene *ob* (ZHANG et al., 1994), é o principal indicador da adiposidade para o cérebro, informando o tamanho dos estoques de tecido adiposo branco (FRIEDMAN & HALAAS, 1998). Assim, este hormônio influencia a circuitaria hipotalâmica envolvida na regulação do apetite, exercendo atividade inibitória (KALRA et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2000; BLUNDELL et al., 2001). Esta inibição ocorre através de aumento e

diminuição da expressão gênica de peptídeos anorexígenos e orexígenos, respectivamente (KALRA et al., 1999).

Outra região hipotalâmica envolvida no balanço energético é o núcleo arqueado, onde há neurônios envolvidos na síntese e liberação de neuropeptídeos orexígenos, como o neuropeptídeo Y (NPY), e anorexígenos, como o α -MSH. Essa região possui receptores para a leptina e para a insulina, as quais inibem a expressão gênica de NPY, e estimulam a de pro-opio-melanocortina (POMC) (BENOIT et al., 2002; SCHWARTZ et al., 1997).

Tanto a insulina como a leptina são secretadas para a corrente sanguínea em proporções diretas aos estoques de gordura corporal e ambas interagem com neurônios alvo no núcleo arqueado. Insulina e leptina ativam neurônios POMC, e estes liberam α -MSH que, por sua vez, ativa neurônios envolvidos na diminuição da ingestão alimentar e no aumento do gasto energético. Contrariamente, a insulina e a leptina diminuem a síntese e liberação de NPY e AgRP, ocorrendo redução da concentração destes neurotransmissores, que são estimulantes da ingestão alimentar (revisado por NISWENDER & SCHWARTZ, 2003). Além dos efeitos no SNC, a leptina também exerce efeito em estruturas periféricas, como mostra a Tabela 2:

Tabela 2. Efeitos da leptina em diferentes órgãos e tecidos.

Órgão/ Tecido	Efeito	Mecanismo
Cérebro	↓ ingestão alimentar	↓ NPY, ↓ AgRP, ↑ POMC
	↑ gasto energético	?
	↑ SNS	?
	↓ HPA	↓ liberação de CRH
Fígado	↑ gliconeogênese	↑ PEPCK
Pâncreas	↓ insulina	+ PDE
Músculo	↑ captação de glicose	↑ GLUT4
	↑ metabolismo de lipídeos	?
Adipócitos	↓ síntese de ácidos graxos	?

Adaptado de Sandoval & Davis, 2003.

Embora a leptina possa interferir na modulação da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático, durante o estresse, pode ocorrer sinalização de oposição na regulação de sua expressão pelos hormônios do estresse. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, através dos glicocorticóides, estimula a secreção de leptina, enquanto que o sistema nervoso simpático, através da interação das catecolaminas com os subtipos β_3 de adrenoreceptores, inibe a sua síntese e liberação. Este efeito paradoxal pode ajudar a compreender por que a concentração de leptina varia conforme o tipo, a intensidade e a duração do estresse. Observa-se que quanto mais prolongado for o estresse ou quanto maior for a sua intensidade, menor a concentração de leptina (revisado por SANDOVAL & DAVIS, 2003).

Entretanto, o efeito do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático sobre o metabolismo energético não depende apenas da interação com a leptina, mas pode ser exercido diretamente. O sistema nervoso simpático promove aumento do gasto energético, aumentando o metabolismo basal (SAAD et al., 1991; TOUBRO et al., 1996). O hormônio liberador de corticotrofina (CRH), como anteriormente citado, é um neuropeptídeo anorexígeno. Os glicocorticóides, além de todas as funções citadas, também desempenham ação modulatória sobre o comportamento alimentar, sendo considerado orexígeno (DALLMAN et al., 1993).

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático promove aumento da glicemia, e a glicose é outro sinalizador do aporte energético do organismo. Além dos receptores de leptina e de insulina, alguns neurônios localizados no tronco encefálico e no hipotálamo (OOMURA et al., 1969; YETTETFI et al. 1997) são sensíveis à glicose (LEVIN et al., 1999). Assim, pequenas alterações da glicemia podem ser percebidas por essas células, que emitem uma resposta sinérgica com outras células responsivas a diferentes sinalizadores (como insulina, corticosterona, glucagon) e convergem aos centros integradores, como o hipotálamo.

1.5. A Contribuição do Laboratório de Estudos do Estresse (LABEEST) para a Compreensão dos Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Reação de Estresse

A equipe do LABEEST investiga os mecanismos endócrinos, cardiovasculares e metabólicos envolvidos na reação de estresse. Os estressores empregados são a natação e o choque nas patas.

Em átrio direito de ratos submetidos à natação, os autores observaram que ocorria aumento de sensibilidade à isoprenalina e à adrenalina. Estas variações de sensibilidade às catecolaminas eram devidas à inibição da captação extra-neuronal e alteração conformacional dos adrenoceptores β_1 e não eram observadas se os animais fossem previamente adrenalectomizados ou tratados com metirapona, um inibidor da síntese de glicocorticóides (SPADARI et al., 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988). Posteriormente, Marcondes et al. (1996) demonstraram que ratas submetidas ao mesmo protocolo experimental apresentavam alterações semelhantes aos machos, quando sacrificadas em diestro, mas, se sacrificadas no estro, as alterações de sensibilidade não eram observadas. Estes resultados chamaram a atenção para a influência dos hormônios sexuais nas alterações de sensibilidade induzidas por estresse em átrio direito de ratos (RODRIGUES et al., 1995).

Utilizando o outro modelo de estresse, o choque nas patas, Marcondes et al. (1996) verificaram que átrio direito de ratas, sacrificadas durante o diestro, ocorria subsensibilidade à noradrenalina. Vanderlei et al. (1996) ampliaram estes achados ao verificarem que parte desta subsensibilidade era devido ao aumento da recaptação neuronal da noradrenalina. Estes autores observaram também que no tecido subsensível à noradrenalina ocorria aumento de sensibilidade à adrenalina e à isoprenalina. Estes resultados mostram que, assim como verificado em átrio direito de ratos machos (BASSANI & DE MORAES, 1988), o protocolo de estresse utilizado induziu uma população heterogênea de receptores β_1/β_2 -adrenérgicos, no tecido atrial de ratas

sacrificadas no diestro. Posteriormente, Spadari-Bratfisch e colaboradores (1999) demonstraram que átrios direitos de ratas sacrificadas durante o diestro responderam às concentrações nanomolares de TA2005 (agonista seletivo para adrenoceptores β_2), sendo esta resposta abolida pelo ICI118551 (antagonista de adrenoceptores β_2). Estes resultados permitiram confirmar a participação do receptor adrenérgico β_2 na resposta cronotrópica. Recentemente, Santos (2002) e Santos et al. (2002) demonstraram que, em átrio direito de ratos machos e de fêmeas sacrificadas no diestro, submetidos ao estresse por choque nas patas, onde observou-se aumento de sensibilidade a agonistas não-seletivos e seletivos de receptores β_2 , ocorre aumento na expressão desta proteína. Assim, estes resultados sugerem que a supersensibilidade aos diferentes agonistas já mencionados pode ser consequência de aumento da expressão do subtipo β_2 de adrenoceptores, mas que a subsensibilidade à noradrenalina, demonstrada em experimentos farmacológicos, deve-se, provavelmente, a alterações na sinalização intracelular deste receptor e/ou nos processos de recaptação e de metabolização dos agonistas, já que não ocorreu modificação na expressão do subtipo β_1 . Além disso, estes autores mostraram que as formas clássica e atípica dos sítio do subtipo β_1 de receptor adrenérgico são independentemente reguladas em tecido atrial direito de ratas, sendo que a afinidade do sítio atípico por antagonistas dependente da fase do ciclo estral (SANTOS & SPADARI-BRATFISCH, 2001; SANTOS et al., 2003).

Aumento da sensibilidade da resposta mediada pelo subtipo β_2 de receptor adrenérgico também foi encontrado em átrio direito de cobaias submetidas ao estresse por choque nas patas (SOUZA, 2001).

Em estudos realizados por Moura (2002), avaliando a resposta inotrópica em átrio esquerdo de ratos submetidos ao estresse por choque nas patas, foi verificado que a população de adrenoceptores neste tecido, assim como em átrio direito, é heterogênea. O aumento da sensibilidade da resposta inotrópica positiva é mediado pelo subtipo β_2 de adrenoceptores, e parece ser similar àquele descrito em átrio direito de ratas sacrificadas no diestro e de ratos. Em átrio esquerdo de ratos submetidos ao estresse por choque nas patas, o subtipo β_3 de adrenoceptores parecem mediar uma resposta inotrópica negativa, que não foi observada em átrio direito.

O estresse por choque nas patas eleva em duas vezes a concentração sérica de corticosterona de ratos e ratas sacrificadas em diestro. Porém, não há alteração na expressão

das proteínas dos receptores de glicocorticóides em átrios direitos destes mesmos animais, comparados com ratos controle (SANTOS, 2002; SANTOS & SAPADARI-BRATFISCH, 2003).

Com o prosseguimento dos trabalhos, e a compreensão de que o estresse determina alterações de sensibilidade adrenérgica em tecido cardíaco, as quais estão relacionadas com a resposta hormonal ao agente estressor, surgiu interesse em avaliar se alterações semelhantes ocorreriam em outros tecidos que, reconhecidamente, sejam alvos para ação das catecolaminas.

Neste sentido, nós demonstramos que as alterações de sensibilidade da resposta adrenérgica causadas por estresse ocorrem também em adipócitos epididimais isolados de ratos submetidos a três sessões de choque nas patas. Nestas células adiposas ocorreu supersensibilidade ao isoproterenol e à adrenalina e subsensibilidade à noradrenalina e ao BRL37344 (FARIAS-SILVA et al., 1999). A resposta analisada foi a liberação de glicerol, a qual foi tomada como índice da lipólise que ocorre em resposta às catecolaminas.

Estes resultados conferiram importância fisiológica considerável ao fenômeno descrito neste modelo experimental, pois sugerem que as alterações de sensibilidade adrenérgica, induzidas por estresse, não se restringem ao tecido cardíaco, mas que se manifestam também em outros tecidos, e que as alterações cardiovasculares dele decorrentes podem ser acompanhadas de alterações endócrinas e metabólicas, com repercussão sistêmica.

Entretanto, restava demonstrar se as alterações de sensibilidade observadas *in vitro* poderiam também ser observadas *in vivo*. Verago et al. (2001) utilizaram ratos machos, alimentados e conscientes, após terem sido submetidos a três sessões diárias de estresse por choque nas patas, para estudar o efeito deste protocolo experimental sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilgliceróis. Aqueles autores mostraram que as concentrações plasmáticas de corticosterona aumentaram significativamente após cada sessão; as de glicerol não se alteraram; as de triacilgliceróis aumentaram apenas após a 1ª sessão, e as concentrações plasmáticas de glicose aumentaram após as 2ª e 3ª sessões de choques nas patas.

A ausência de alterações na concentração plasmática de glicerol, apesar dos

níveis elevados de corticosterona e, provavelmente, de catecolaminas endógenas, que se segue ao estresse, foi curiosa, pois, aceita-se que nestas condições, a lipólise está aumentada e que, como consequência, a liberação de glicerol estaria elevada. Assim, estes dados sugerem que poderia haver um aumento do *turnover* de glicerol em ratos submetidos a estresse. Por outro lado, como as concentrações de triacilgliceróis aumentaram após a 1ª sessão e as de glicose, após as 2ª e 3ª sessões, poder-se-ia sugerir que após a 1ª sessão de choques, o glicerol liberado estaria sendo utilizado para a síntese de triacilgliceróis pelas células hepáticas, mas que, com a repetição de estresse, a função hepática poderia estar sendo redirecionada para a liberação de glicose.

Recentemente, Sampaio-Barros et al. (2003) utilizando ratos submetidos a diferentes protocolos de estresse por natação, demonstrou que a intensidade e a duração do agente estressor podem modular a utilização dos substratos energéticos, mas que a mobilização pode ser semelhante.

Concluindo, os trabalhos desenvolvidos no LABEEST mostraram que o estresse promove: alterações cardiovasculares e metabólicas, dependentes tipo e da intensidade do agente estressor. No caso e fêmeas, a sensibilidade às catecolaminas em resposta ao estresse pode sofrer modificações decorrentes da fase do ciclo estral.

Estas conclusões deram origem a novas perguntas, algumas das quais pretendemos responder nesta tese. São elas:

- o estresse por choque nas patas altera a sensibilidade à insulina em adipócitos epididimais isolados de ratos?
- a diminuição de peso corporal dos animais submetidos a estresse, previamente relatada, está associada a alterações nas concentrações plasmáticas de leptina e de insulina?
- A quantidade de receptores β -adrenérgicos e de glicocorticóides em tecido adiposo epididimal de ratos submetidos a estresse por choque nas patas está modificada?

II. OBJETIVOS

Considerando que o choque nas patas promove alterações fisiológicas que têm repercussões endócrinas e metabólicas possíveis de serem demonstradas *in vivo* e *in vitro*, o objetivo deste trabalho foi o de analisar os aspectos hormonais, moleculares e comportamentais envolvidos nessas modificações desencadeadas pelo estresse. Para isso, foram nossos objetivos específicos:

- a) analisar se o estresse por choque nas patas altera a sensibilidade à insulina;
- b) verificar se a diminuição de peso corporal dos animais submetidos a estresse, previamente relatada, está associada a alterações na concentração plasmática de leptina e de insulina;
- c) quantificar, através da técnica de “western blotting”, os receptores β -adrenérgicos e de glicocorticóides em tecido adiposo epididimal de ratos submetidos a estresse por choque nas patas;

III. RESULTADOS

Os resultados obtidos foram organizados em manuscritos. Destes, 01 foi publicado, outro foi submetido à publicação e um terceiro está sendo preparado para submissão a periódico especializado. Esta publicação e os manuscritos são apresentados na forma de capítulos.

III.1. *Capítulo 1*

Trabalho apresentado no XVI Latinamerican Congress of Pharmacology, realizado em Águas de Lindóia, São Paulo, de 13 a 17 de setembro de 2000 e publicado no “Canadian Journal of Physiology and Pharmacology” volume 80 (8):783-789, 2002.

Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot shock stress

Elisângela Farias-Silva, Marília M. Sampaio-Barros, Maria E. C. Amaral, Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschero, Dora M. Grassi-Kassisse and Regina C. Spadari-Bratfisch

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Running Title: Stress-induced insulin subsensitivity

Abstract

We examined the effect of three daily foot shock stress sessions on glucose homeostasis, insulin secretion by isolated pancreatic islets, insulin sensitivity of white adipocytes, and glycogen stores in the liver and soleus muscle of rats. Stressed rats had plasma glucose (128.3 ± 22.9 mg/dl) and insulin (1.09 ± 0.33 ng/ml) levels higher than the controls (glucose: 73.8 ± 3.5 mg/dl; insulin: 0.53 ± 0.11 ng/ml, $p < 0.05$, ANOVA plus Fischer test; $p < 0.05$). After a glucose overload, the plasma glucose but not insulin levels remained higher (area under the curve 8.19 ± 1.03 vs 4.84 ± 1.33 g/dl 30 min and 102.7 ± 12.2 vs 93.2 ± 16.1 ng/ml 30 min, respectively). Although the area under the insulin curve was higher in stressed (72.8 ± 9.8 ng/ml) compared to control rats (34.9 ± 6.9 ng/ml) in the initial 10 minutes after glucose overload. The insulin release stimulated by glucose in pancreatic islets was not modified after stress. Adipocytes basal lipolysis was higher (stressed: 1.03 ± 0.14 ; control: 0.69 ± 0.11 μ mol of glycerol in 60 min/100 mg of total lipids) but maximal lipolysis stimulated by norepinephrine was not different (stressed: 1.82 ± 0.35 ; control: 1.46 ± 0.09 μ mol of glycerol in 60 min/100 mg of total lipids) after stress. Insulin dose-dependently inhibited the lipolytic response to norepinephrine by up to 35% in adipocytes from control rats but had no effect on adipocytes from stressed rats. The liver glycogen content was unaltered by stress, but was lower in soleus muscle from stressed compared with control rats (0.45 ± 0.04 vs 0.35 ± 0.04 mg/100 mg of wet tissue). These results suggest that rats submitted to foot shock stress develop hyperglycemia along with hyperinsulinemia as a consequence of insulin subsensitivity in adipose tissue, with no alteration in the pancreatic sensitivity to glucose. Foot shock stress may therefore provide an useful short-term model of insulin subsensitivity.

Key words: glucose tolerance test – white adipocytes – lipolysis– pancreatic islets
insulin release - soleus muscle - liver glycogen

Introduction

It is well established that hyperglycemia and glucose intolerance may occur under conditions of severe stress, such as trauma, burn, operation, or myocardial infarction in patients with prior history of diabetes (Yamada et al. 1993). It is also known that the regulation of glucose and lipid metabolism is under the influence of the sympathetic nervous system, cytokines (Nonogaki 2000), and increased plasmatic levels of corticosterone and glucagon acting synergistically with the catecholamines to increase glycemia during stress (Yamada et al. 1993). However, the precise relationship between stress-induced increments in circulating metabolic hormone levels and the sensitivity of tissues to these mediators during repeated or prolonged stress has not yet been elucidated.

In rats submitted to three daily sessions of foot shock stress the plasma corticosterone levels increased significantly after each stress session and triacylglycerol levels increased after the first session, whereas plasma glucose levels increased after the second and third sessions. The increases in plasma glucose and corticosterone levels were more pronounced after the third session than after the first and second ones, suggesting that insulin resistance might be induced by foot shock stress (Verago et al. 2001).

During stress, white adipose tissue lipolysis is greatly stimulated together with an increase in reesterification to remove the excess of free fatty acids released (Wolfe et al. 1990, Coppack et al. 1994). An increase in serum free fatty acid levels is linked to poor glycemic control (Boden 1996) and insulin resistance in fructose feeding rats and rats fed high fat diets (Storlien et al. 1991). Although genetic influence undoubtedly is a strong factor in the predisposition to insulin resistance, life-style factors such as diet (Storlien et al. 1993) and stress (Kai et al. 2000) also play a significant role in the development of the symptoms at least in susceptible subjects.

Lipolysis in white adipose tissue is controlled mainly by catecholamines and insulin. Rat adipose tissue has predominantly β_1 and β_3 -adrenoceptors, but also β_2 -adrenoceptors, which mediate the lipolytic response to catecholamines (Langin et al. 1991), while insulin is the major endogenous lipogenic hormone (Lafontan and Langin 1995). We have previously reported altered sensitivity to catecholamines in tissues isolated from rats

submitted to three daily sessions of foot shock stress (Vanderlei et al. 1996, Spadari-Bratfisch et al. 1999, Farias-Silva et al. 1999). Epididymal fat cells isolated from rats submitted to this stress model are subsensitive to noradrenaline and BRL37344, and supersensitive to isoprenaline. ICI118551, a β_2 -adrenoceptor antagonist, abolished the supersensitivity to isoprenaline, but metoprolol did not alter the subsensitivity to noradrenaline or BRL37344 (Farias-Silva et al. 1999). These findings indicate that the response mediated by the β_2 -adrenoceptor subtype increased whereas the β_1 -adrenoceptor-mediated response desensitized in adipocytes from stressed rats. The sensitivity to insulin had not yet been investigated.

In this work we examined the effects of three daily foot shock sessions on rat glucose homeostasis, insulin secretion by isolated pancreatic islets, white adipocyte insulin sensitivity and liver and soleus muscle glycogen stores, in order to assess whether these animals were developing insulin resistance. If confirmed this could be a useful model for the study of the early mechanisms of stress triggering insulin resistance.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 250 to 350 g at the beginning of the experiments were used. The animals were housed in individual cages (30 cm x 18 cm x 20 cm) in a temperature-controlled room (22°C), on a 12 h light/dark cycle with lights on at 6:30 a.m. The rats remained in the animal care facilities for at least one week before entering the experimental protocol. During this period, they were handled for 15 min on five successive days. Standard laboratory chow and tap water were available *ad libitum*. During the experiments, the animals were cared for in accordance with the principles for the use of animals in research and education, as laid down in the Statement of Principles adopted by the FASEB Board. The experimental protocols were also approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (certificate number 0555-1).

Blood vessel catheterization

The rats were anesthetized with xylazine (50 mg/kg, i.m.) and ketamine (0.01 mg/kg, i.m.), and after this the left carotid artery and vein were catheterized with PE20 tubing (siliconized and filled with 5 mM sodium citrate) connected to PE50 tubing (25 cm long, filled with 0.9% NaCl) which was exteriorized in the dorsal interscapular region where the canulas were fixed to the animal's skin (Popovic and Popovic 1960). This method allowed the collection of blood samples from unanesthetized, undisturbed freely moving rats.

Stress procedure

Each rat underwent three daily sessions of unsignaled, inescapable foot shocks as previously described (Farias-Silva et al. 1999). The animals were placed in a Plexiglas chamber (26 cm x 21 cm x 26 cm) provided with a grid floor made of stainless-steel rods (0.3 cm in diameter and spaced 1.0 cm apart). During the 30 min sessions, which occurred between 7:30 a.m. and 11:00 a. m., the foot shocks were delivered by a constant current source controlled by a microprocessor-based instrument constructed at the university's Biomedical Engineering Center (UNICAMP). The current intensity was 1.0 mA with a duration of 1.0 s at random intervals of 5-25 s (mean interval of 15 s). The rats were returned to their cages at the end of each foot shock session.

Glucose tolerance test (GTT)

The jugular vein and carotid artery of rats were catheterized 24 h before the first foot shock session, as above described. An intravenous glucose tolerance test (*iv*GTT) was done in 8-12 h fasted rats, and immediately after the third foot shock session (stressed group) or after remaining in the foot shock cage without receiving foot shocks (control group). Using the catheter implanted in the left jugular vein, the rats received one injection of 1.5 g of glucose. kg⁻¹ of body weight, in a final volume of 800 µl. Blood samples (100 µl each) were obtained from the catheterized artery at -5, 3, 5, 10, 15, and 30 min after

glucose injection for the determination of insulin and glucose plasma levels. Plasma glucose and insulin levels were compared during the glucose tolerance test by estimating the total areas under the curves (glycemia vs time and insulinemia vs time) by using the trapezoidal method (Matthews et al. 1990).

Hepatic and muscular glycogen content

Samples of liver and soleus muscle were obtained to determine the glycogen content according to Lo et al. (1970) with minor modifications. Following collection, the tissues were frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C. The liver and muscle samples were weighed and immersed in a 30% KOH saturated with Na₂SO₄. Ninety-five percent ethanol was added to precipitate the glycogen from the alkaline digestion. The samples were centrifuged and supernatants were carefully aspirated. The pellets were dissolved in a mixture of distilled water, phenol (5%) and concentrated H₂SO₄. The absorbance was read in a Beckman DU[®]-640 spectrophotometer (Fullerton, CA, USA) and the results were expressed in mg of glycogen/100 mg wet weight of tissue.

Adipocyte preparation and lipolysis measurements

Lipolytic activity was analyzed in isolated fat cells obtained from epididymal white adipose tissue according to the method of Rodbell (1964), with minor modifications. Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRBA) containing bovine serum albumin (3%), glucose (6 mM) and HEPES (10 mM), adjusted to pH 7.4 with 1 M NaOH, was used. After collagenase treatment (1 mg/ml), isolated fat cells were filtered through a nylon mesh, washed three times and the packed cells were brought to a 10% dilution with KRBA buffer (Farias-Silva et al., 1999). This cell concentration represents by around 80,000 cells/ vial. The cells were incubated in plastic vials with gentle shaking in a water bath at 37°C, containing 100 µM norepinephrine, in the presence of insulin (1 - 500 µU/ml). Pharmacological agents at suitable dilutions were added to the cell suspension just before the beginning of the assay to obtain a final volume of 1 ml. After a 60 min incubation, the tubes were transferred to an ice bath, and 200 µl aliquots of the infranatant medium were

taken for enzymatic determination of glycerol (Wiand 1957), which was used as an index of fat cell lipolysis. The total lipid content was evaluated gravimetrically after extraction (Dole and Meinertz 1960).

Determination of insulin secretion by isolated pancreatic islets

Groups of four islets isolated by collagenase digestion of the pancreas were incubated for 30 min at 37°C in Krebs-bicarbonate buffer containing 5.6 mmol glucose/L and equilibrated with 95% O₂ / 5% CO₂, pH 7.4. The solution was then replaced with fresh Krebs-bicarbonate buffer and the islets were incubated a further hour in medium containing increasing concentrations of glucose (2.8, 5.6, 8.3, 11.1, 16.7 and 22.2 mmol glucose/L). The incubation medium contained (in mmol/L): NaCl 115, KCl 5, NaHCO₃ 24, CaCl₂ 2.56, MgCl₂ 1, and BSA 0.3% (w/v) (Boschero et al. 1995). The insulin released after the 1 h incubation was measured by RIA, as previously described (Scott et al. 1981), using rat insulin as the standard. The amount of insulin (ng/ 60 min) released per islet in the presence of 5.6 mmol glucose/L was considered as the basal insulin release; the maximal insulin release was considered to be obtained when increasing doses of glucose did not increase insulin release; the glucose EC₅₀ value was the concentration of glucose inducing an insulin release which was 50% of the maximum.

Analytical determinations

All blood samples were collected into plastic vials in an ice-water bath and immediately centrifuged at 50 g for 10 min at 4°C. Aliquots of plasma were removed and stored at -20°C until assayed for plasma insulin and glucose levels. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method (commercial kit, Laborlab S/A, Brazil). Plasma insulin was determined by radioimmunoassay (Boschero et al. 1995).

Drugs and chemicals

ATP, bovine serum albumin (fraction V), glycerol phosphate dehydrogenase type I from rabbit muscle, glycerol kinase from *Candida micoderma*, NAD, (-)-norepinephrine and sodium citrate were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Xylazine was from Bayer S.A (Brazil) and ketamine was from Konig S.A. (Argentina). Collagenase was from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Antiserum against insulin was kindly provided by Dr Leclercq-Meyer (Faculty of Medicine, Brussels Free University, Brussels, Belgium). The rat insulin standard was from Novo-Nordisk (Copenhagen, Denmark).

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SEM. ANOVA plus Fisher's test or Student's *t* test were used to compare data obtained from adipocytes and the pancreatic islet assays, as well as the individual values from the GTT in stressed and control rats. The area under the curve was determined by the trapezoidal method (Matthews et al. 1990) and used to compare data obtained in the GTT by using Student's *t* test. The glycogen levels in liver or soleus muscle from stressed and control rats were compared using Student's *t*-test. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

Results

The plasma glucose levels of 12 h fasting foot shock stressed rats were significantly higher than control rats (128.3 ± 22.9 mg/dl vs 73.8 ± 3.5 mg/dl, $p < 0.05$, Student's *t*-test). During the *iv*GTT, the glucose levels increased immediately after glucose injection (control, 287.5 ± 38.1 ; stressed, 466.5 ± 88.2 mg/dl, $p < 0.05$, Student's *t*-test) and remained higher in stressed than in control rats until 30 min after this procedure (control: 78.7 ± 24.0 mg/dl; stressed: 157.2 ± 36.4 mg/dl, $p < 0.05$, Student's *t*-test). The area under the glucose time course curve (Figure 1) was greater in foot shock stressed rats (8.19 ± 1.03 g/dl.30 min) than in control rats (4.84 ± 1.33 g/dl.30 min, $p < 0.05$, Student's *t* test). Plasma insulin levels were also higher in stressed than in control rats immediately before (1.09 ± 0.33 ng/ml vs 0.53 ± 0.11 ng/ml, $p < 0.05$, ANOVA plus Fischer test), and 3 min (5.59 ± 0.80 ng/ml vs 4.19 ± 0.64 ng/ml, $p < 0.05$, ANOVA plus Fischer test), 5 min (8.01 ± 1.78 ng/ml vs 4.12 ± 1.04 ng/ml, $p < 0.05$, ANOVA plus Fischer test), and 10 min after glucose administration (4.86 ± 0.54 ng/ml vs. 3.70 ± 0.79 ng/ml, $p < 0.05$, ANOVA plus Fischer test). The area under the insulin time course curve was greater in stressed (72.8 ± 9.8 ng/ml.10 min) than in control rats (34.9 ± 6.9 ng/ml.10 min; $p < 0.05$, Student's *t*-test; Figure 1) in the initial ten minutes. However, if we consider all the 30 minutes period, there was no difference between control (102.7 ± 6.9 ng/ml.30 min) and stressed rats (93.2 ± 6.9 ng/ml.30 min).

Table 1 shows the insulin secretion from isolated islets in response to increasing concentrations of glucose. The insulin secretion in response to 5.6 mmol glucose/L was higher in pancreatic islets from stressed rats (1.18 ± 0.24 ng/islet.60 min) than from control rats (0.58 ± 0.07 ng/islet.60 min). However, insulin release in response to 8.3, 11.1, 16.7 and 22.2 mmol glucose/L was not different between the two groups (Figure 2).

Basal glycerol release by adipocytes from control and stressed rats were 0.69 ± 0.11 and 1.03 ± 0.14 μ mol of glycerol in 60 min/100 mg total lipids, respectively ($p < 0.05$, Student's *t*-test). The maximal glycerol release in response to norepinephrine was 1.46 ± 0.09 and 1.82 ± 0.35 μ mol of glycerol in 60 min/100 mg total lipids in adipocytes from

control and stressed rats, respectively. The inhibition exerted by 1, 5, 10, 50, 100 and 500 μ U of insulin/ml on the *in vitro* lipolytic response stimulated by 100 μ M norepinephrine was 15%, 14%, 24%, 28%, 28% and 37%, respectively, in adipocytes from control rats; in adipocytes from stressed rats, insulin caused no inhibition of this response ($p < 0.05$, Student's *t*-test, Figure 3).

The glycogen content of liver from stressed rats (4.75 ± 0.21 mg/ 100 mg of wet tissue) was not different from the controls (4.54 ± 0.26 mg/ 100 mg of wet tissue), but the soleus muscle from stressed rats had less glycogen than control (0.35 ± 0.04 vs 0.45 ± 0.04 mg/ 100 mg of wet tissue, $p < 0.05$, Student's *t*-test).

Table 1. Insulin release stimulated by 5.6 mmol glucose/L (basal) and 16.2 mmol glucose/L (maximal secretion), and the glucose EC₅₀ in pancreatic islets isolated from control and stressed rats.

	control	stress
basal insulin release	0.58 ± 0.07	1.18 ± 0.24*
maximal insulin release	17.72 ± 1.99	21.29 ± 3.04
EC ₅₀ (mM)	12.10 ± 0.53	12.20 ± 0.44

Values are means ± SEM (n=3, in duplicate) and are expressed in ng/islet. * p<0.05 (ANOVA plus Fisher's test).

Table 2. Basal and maximal lipolysis induced by norepinephrine (100 µM) in the absence and presence of 500 of insulin µU/ml.

lipolysis	control	stress
basal	0.69 ± 0.11 ^a	1.03 ± 0.14 ^b
norepinephrine	1.46 ± 0.09 ^c	1.82 ± 0.35 ^c
norepinephrine + insulin	1.11 ± 0.05 ^b	1.66 ± 0.25 ^c

Values are means ± SEM (n=4, in duplicate) and are expressed in µmol of glycerol released in 60 min/100 mg of total lipids. Different letters indicate groups which are significantly different from each other, p<0.05 (ANOVA plus Fisher's test).

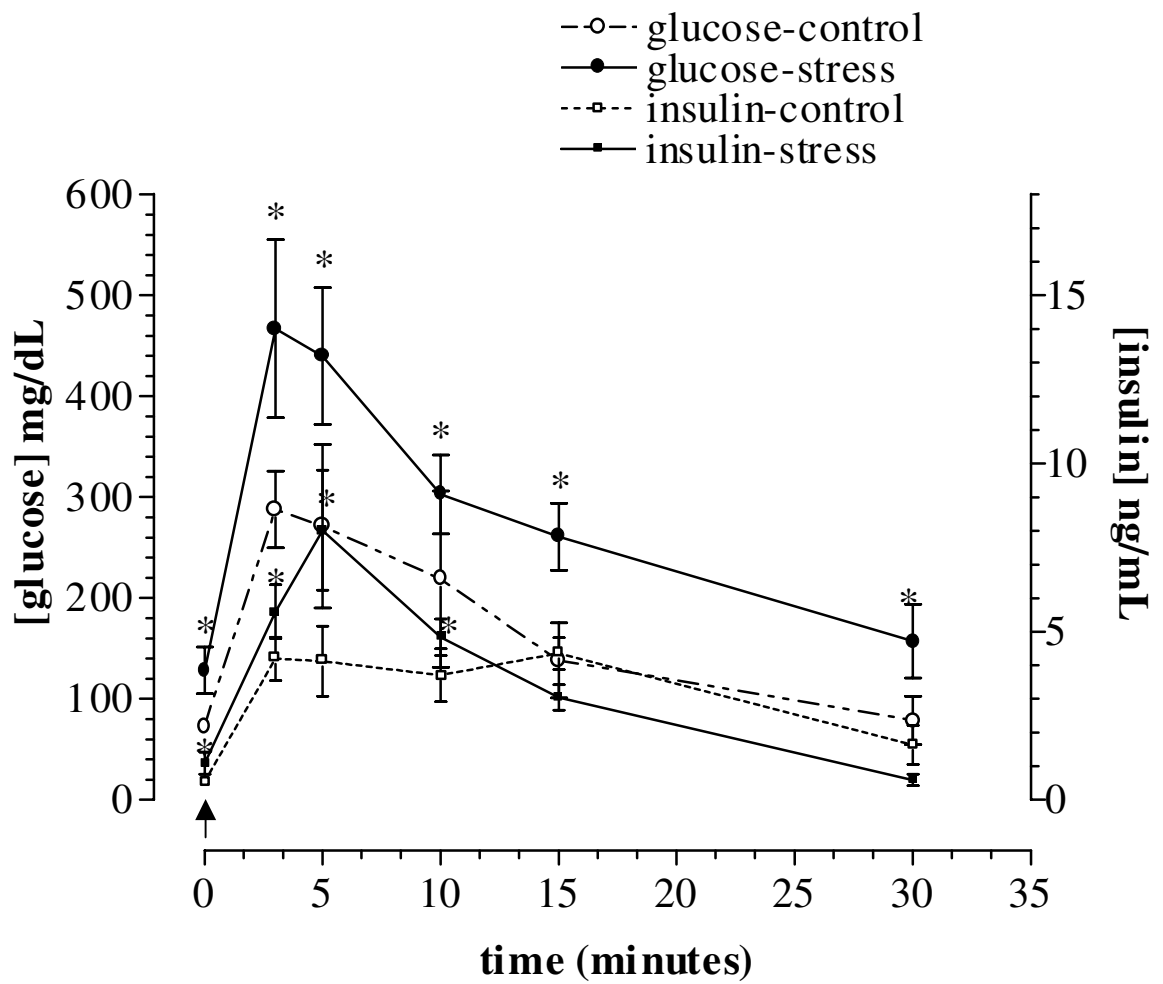


Figure 1: Glucose tolerance test (*iv*GTT) and plasma insulin levels before and after an *i.v.* injection of a glucose solution in control and foot shock stressed rats. Blood was collected from the catheterized carotid artery of conscious, fasted (12 h) control (n=5) and stressed (n=5) rats. *p<0.05 compared to the corresponding controls (ANOVA plus Fisher test). The area under the curves for glucose and insulin were significantly different between control and stressed rats (Student's *t*-test). The arrow indicates the time of glucose injection.

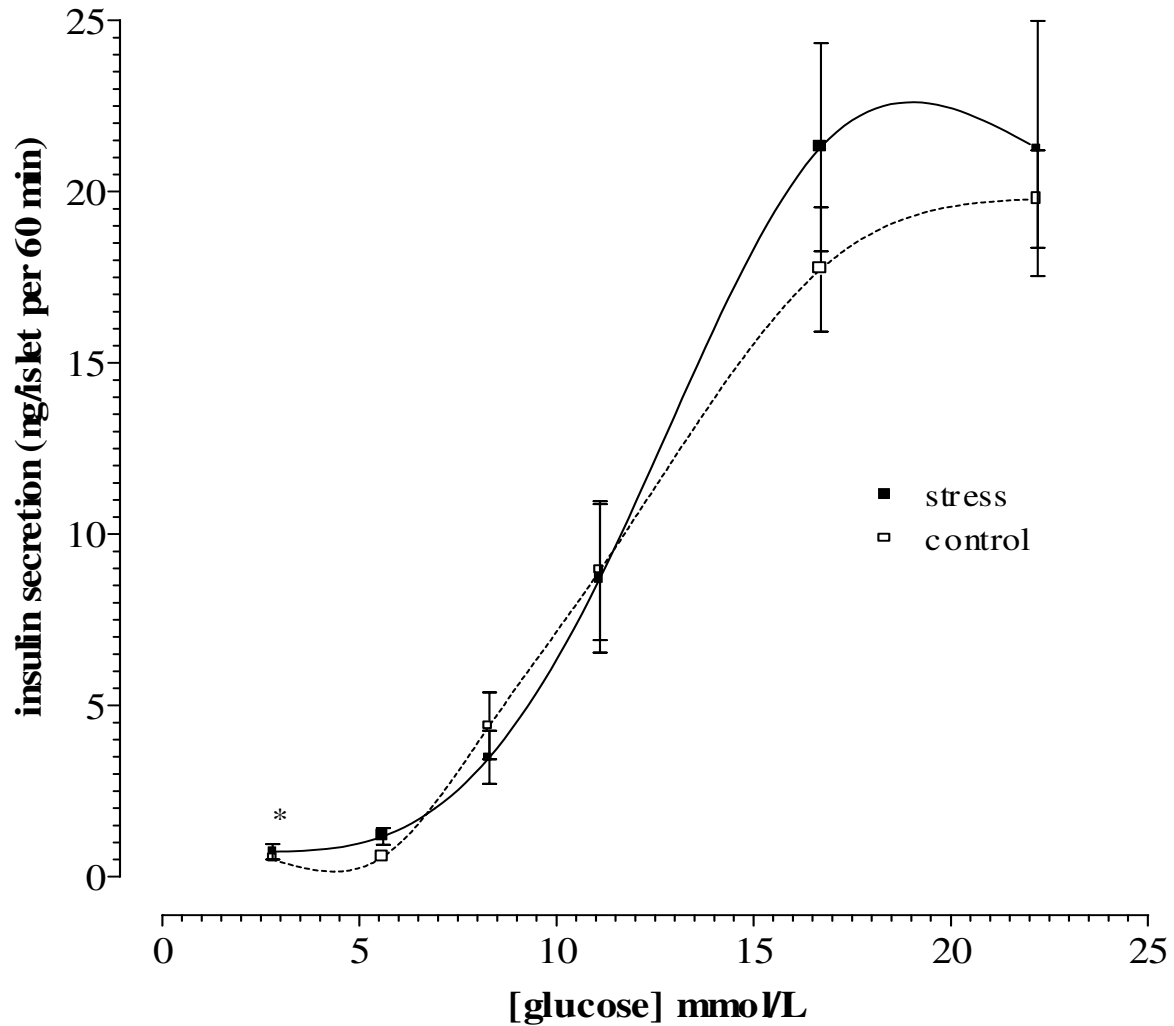


Figure 2: Concentration-response curves to glucose in pancreatic islets isolated from control and foot shock stressed rats sacrificed after the third foot shock session. Each point represents the mean $\pm$ SEM of three independent assays. The insulin secretion was expressed as ng of insulin released by islet in 60 minutes, as stated in Table 1.

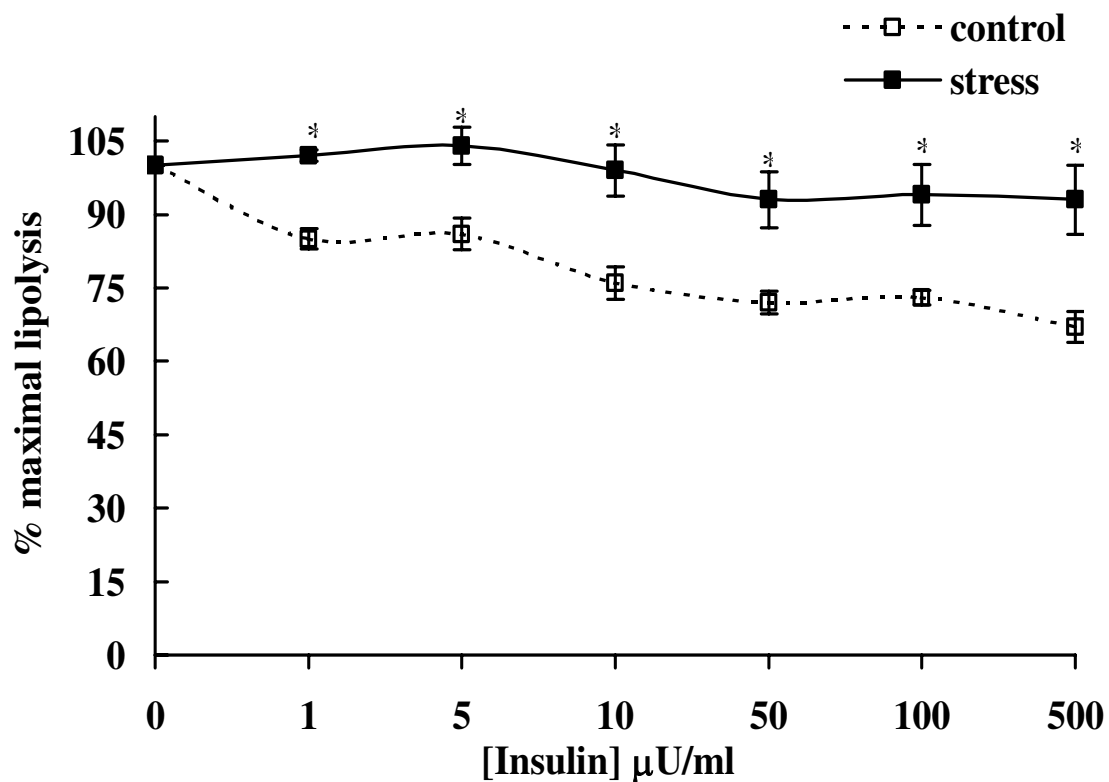


Figure 3: Antilipolytic action of insulin on the glycerol release stimulated by 100 μM norepinephrine in adipocytes isolated from control and foot shock stressed rats. Each point represents the mean $\pm$ SEM of four independent assays done in duplicate. The values for 100% are shown in Table 2. * $p < 0.05$ compared to the control at the same insulin concentration (Student's t -test).

Discussion

Stress response is characterized by an increase in plasma catecholamines and corticosterone levels (De Boer et al. 1990, Van Der Kar et al. 1991, Konarska et al. 1990). Because its plasma levels increase in parallel with the stressor intensity, corticosterone is an useful indicator of stress (De Boer et al. 1990, Van Der Kar et al. 1991, Verago et al. 2001). We have previously shown that plasma corticosterone levels progressively increased after the first, second and third foot shock sessions and that the increase in plasma glucose levels after the first foot shock session was not significant, but the glycemia was significantly enhanced by repetition of the stressful stimulus, suggesting a sensitization of this response (Verago et al. 2001). An increase in plasma glucose levels is the main stimulus for insulin secretion by pancreatic islets. Accordingly, our present results have shown that hyperglycemia was followed by hyperinsulinemia in foot shock stressed rats (Figure 1). These results differ from those referred by Yamada et al. (1993) for rats submitted to immobilization, in which a decrease in plasma insulin levels was observed along with hyperglycemia. As shown here, stressed rats had higher plasma glucose levels than control rats, and these levels remained higher during the 30 min after glucose overload, thus indicating an altered response to insulin. Indeed, the basal plasma insulin levels were higher in stressed than in control rats and remained higher until 10 min after the glucose overload. Despite this, the static secretion of insulin by pancreatic islets stimulated by increasing concentrations of glucose was not modified after stress.

Catecholamines, glucocorticoids (Yamada et al. 1993) and growth hormone inhibit glucose uptake by peripheral tissue cells, thereby conserving glucose for erythrocytes and neurons. Thus, the hyperglycemia resistant to hyperinsulinemia observed in foot shock stressed rats could be predominantly a consequence of the high levels of these stress hormones rather than a true insulin resistance. Alternatively, this resistance could be due to a decreased sensitivity to insulin in peripheral tissues, since the sensitivity of pancreatic tissue to glucose was altered only at the the lowest concentration of glucose used.

Several hormones, including catecholamines, glucagon, ACTH, and TSH

stimulate lipolysis, whereas insulin (Stralsfors et al. 1984, Londos et al. 1985, Smith et al. 1991, Langin et al. 1996) and adenosine (Olah and Stiles 1992) are endogenous inhibitors of lipolysis in mammalian white adipose tissue. Our results indicate that insulin reduces the lipolytic response of control adipocytes to norepinephrine by 37%, in agreement with a previous report (Faintrenie and G  lo  n 1996). In contrast, in adipocytes from stressed rats, insulin was unable to inhibit the response to norepinephrine.

Tissues response to the regulatory action of insulin depends on its binding to specific receptors and on post-receptor intracellular processes. Glucocorticoids and catecholamines may alter insulin binding to its receptors (Olesfsky et al. 1975, Fantus et al. 1981), with a negative correlation between plasma corticosterone levels and insulin binding capacity in adipocytes (Macho and Fichov   1992). Changes in insulin binding or in the insulin signaling pathway at a post-receptor level have been reported for muscle and liver of rats treated with dexamethasone and for rats that had been immobilized (Saad et al. 1993, Macho et al. 1999). In addition, stress-induced high plasma corticosterone levels contribute to the altered sensitivity to catecholamines in cardiac tissue from stressed rats (Nourani et al. 1992). Thus, in the present model of stress, high plasma levels of glucose, insulin and corticosterone were associated with an impaired sensitivity of tissues to catecholamines (Farias-Silva et al. 1999; Spadari-Bratfisch et al. 1999) and to insulin, leading to insulin subsensitivity, which might lead to insulin resistance.

In support of this hypothesis, the glycogen content of soleus muscle, but not liver, was reduced in stressed rats. Skeletal muscle is a major target tissue of insulin (De Fronzo et al. 1981) since glucose has little or no effect in muscle and adipose tissue in the absence of insulin which stimulates glucose uptake. Whereas glucose is the main regulator of the hepatic glycogen synthase, the key enzyme in glycogen synthesis (Glinsmann et al. 1970, Kruszynska et al. 1986), insulin has only a marginal effect on this protein (Nakamura et al. 1984). Moreover, insulin inhibits glycogen phosphorylase activity only in the liver (Witters and Avruch 1978, Ciudad et al. 1979, Nuttall et al. 1983, Yki-Jarvinen et al. 1987, Damsbo et al. 1991, Kelley et al 1992).

The combination of high plasma glucose and insulin levels, seen in foot shock stressed rats supposedly increases glucose uptake and stimulates liver and muscle glycogen synthesis. Our results showed that the liver of stressed rats apparently responded normally

to high plasma glucose and insulin levels since the glycogen content of this organ was not altered after stress. In contrast, the glycogen content of soleus muscle from stressed rats was lower than in the controls, suggesting that this muscle is resistant to high plasma insulin and glucose levels. Soleus muscle has predominantly type I or slow-twitch red fibers which show high sensitivity to insulin (Armstrong and Phelps 1984, Bonen et al. 1981). Moreover, the biological effects of catecholamines on the skeletal muscle are mediated by β_2 -adrenoceptors (Roberts and Summers 1998) which elevate tissue cyclic AMP levels through the activation of adenylate cyclase (Yang and McElligott 1989). The proteins phosphorylated as a result of cyclic AMP accumulation and protein kinase A activation include glycogenolytic enzymes (Yang and McElligott 1989). In right atria (Spadari-Bratfisch et al. 1999) and isolated epididymal adipocytes (Farias-Silva et al. 1999) from foot shock stressed rats, the response mediated by the β_2 -adrenoceptor subtype is increased. Thus, the depletion of soleus muscle glycogen in the presence of hyperglycemia seen in foot shock stressed rats may represent the sum of insulin subsensitivity and supersensitivity to adrenaline mediated by β_2 -adrenoceptors. Nevertheless, it must be considered that foot shock stress which is induced by pulsatile electrical current on the floor of the cage may cause inevitable twitching and contraction of the soleus muscle which consumes glycogen independently of glycemia, insulinemia or stress hormones plasma concentration. Therefore, in order to confirm the hypothesis of insulin resistance in muscle tissues from foot shock stressed rats; this issue must be additionally investigated. The experiments on glucose uptake by peripheral tissues of stressed rats are to be done in our laboratory.

In conclusion, our results show that hyperglycemia and hyperinsulinemia occur in rats submitted to three daily foot shock sessions, and that isolated white adipocytes and soleus muscle are resistant to the effects of insulin, although the pancreatic islet response to glucose remains unaltered. Together, these results suggest that foot shock stress could be an useful model for studying insulin resistance, induced by environmental factors. If confirmed, this model of insulin resistance can be produced in a short time compared with other insulin resistance models in which long term treatments are needed (Saad et al. 1993, Storlien et al. 1993, Verma et al. 1999), and it is not associated with obesity as it occurs in Otsuba Long-Evans Tokushima (OLEF) rats.

References

- Armstrong R.B., and Phelps R.O. 1984. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171: 259-272.
- Boden, G. 1996. Fatty acids and insulin resistance: *Diabetes Care*, 19: 394-395.
- Bonen, A., Tan, M.H., and Watson-Wright, W.M. 1981. Insulin binding and glucose uptake differences in rodent skeletal muscle. *Diabetes*, 30: 702-710.
- Boschero, A.C., Szpak-Glasman, M., Carneiro, E.M., Bordin, S., Paul, I., Rojas, E. and Atwater I. 1995. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involve M3 muscarinic receptors. *Am. J. Physiol.* 268: E336-E342.
- Ciudad, C.J., Massague, J., and Guinovart, J.J. 1979. The inactivation of glycogen phosphorylase is not a prerequisite for the activation of liver glycogen synthase. *FEBS Lett.*, 99: 321-324.
- Coppack, S.W., Jensen, M.D., and Miles, J.M. 1994. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid. Res.* 35: 177-193.
- Damsbo, P., Vaag, A., Hother-Nielsen, O., and Beck-Nielsen, H. 1991. Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 34: 239-245.
- De Boer, S.F., Koopmans, S.J., Slanger, J.L., and Van Der Gugten, J. 1990. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol. Behav.* 47: 1117-1124.
- De Fronzo, R.A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., and Felber, J.P. 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. *Diabetes*, 30: 1000-1007.
- Dole, V.P., and Meinertz, H. 1960. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235: 2595-2599.

- Faintrenie, G., and G  lo  n, A. 1996. Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 235-238.
- Fantus, I.G., Ryan, J., Hizuca, N., and Gorden, P. 1981. The effect of glucocorticoids on the insulin receptor: an in vivo and in vitro study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 953-960.
- Farias-Silva, E., Grassi-Kassisse, D.M., Wolf-Nunes, V., and Spadari-Bratfisch, R.C. 1999. Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J. Lipid. Res.* 40: 1719-1727.
- Glinsmann, W., Pauk, G., and Hern, E. 1970. Control of rat liver glycogen synthetase and phosphorylase activities by glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39: 774-782.
- Kai, K., Morimoto, I., Morita, E., Okada, Y., Yamamoto, S., Kanda, K., Uriu, K., and Eto, S. 2000. Environmental stress modifies glycemic control and diabetes onset in type 2 diabetes prone Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Physiol. Behav.* 68: 445-452.
- Kelley, D.E., Mokan, M., and Mandarino, L.J. 1992. Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes*, 41: 698-706.
- Konarska, M., Stewart, R.E., and McCarty, R. 1990. Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiol. Behav.* 47: 647-652.
- Kruszynska, Y.T., Home, P.D., and Alberti, K.G. 1986. In vivo regulation of liver and skeletal muscle glycogen synthase activity by glucose and insulin. *Diabetes*, 35: 662-667.
- Lafontan, M., and Langin, D. 1995. Cellular aspects of fuel mobilization and selection in white adipocytes. *Proc. Nutr. Soc.* 54: 49-63.
- Langin, D., Portillo, M.P., Saulnier-Blanche, J.P., Lafontan, M. 1991. Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 291-301.
- Langin, D., Holm, C., and Lafontan, M. 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: A major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 93-109.

- Lo, S., Russel, J.C., and Taylor, A.W. 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28: 234-236.
- Londos, C., Honnor, R.C., and Dlhon, G.S. 1985. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. III. Multiple modes of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 260: 15239-15145.
- Macho, L., and Fichová, M. 1992. In vivo role of corticosterone in regulation of insulin receptors in rat adipocytes during hypokinesia. *Endocr. Regul.* 26: 183-187.
- Macho, L., Fichová, M., Zórad, Š., and Kvetnanský, R. 1999. Changes of insulin binding in rat tissues after exposure to stress. *Physiol. Res.* 48: 51-58.
- Matthews, J.N.S., Altman, D.G., Campbell, M., and Royston, P. 1990. Analysis of serial measurements in medical research. *Brit. Med. J.* 27: 233-235.
- Nakamura, T., Kato, S., and Ichihara, A. 1984. Glucagon and glucose as major regulators of glycogen metabolism in primary cultured rat hepatocytes. *J. Biochem.* 95: 1691-1696.
- Nonogaki, K. 2000. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, 43: 533-549.
- Nourani, F.R.R., Spadari, R.C., De Moraes, S. 1992. Foot shock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-448486 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.* 23: 787-791.
- Nuttall, F.Q., Then, J.W., Niewoehner, C., and Gilboe, D.O. 1983. Response of liver glycogen synthase and phosphorylase to *in vivo* glucose and glucose analogues. *Am. J. Physiol.* 245: E521-E527.
- Olah, M.E., and Stiles, G.L. 1992. Adenosine receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 211-225.
- Olesfsky, J.M., Johnson, J., Liu, F., Jen, P., and Reaven, G. 1975. The effect of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. *Metabolism*, 24: 517-527.

- Popovic, V., and Popovic, P. 1960. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. *J. Appl. Physiol.* 15: 727-728.
- Roberts, S.J., and Summers, R.J. 1998. Cyclic AMP accumulation in rat soleus muscle: stimulation by β_2 - but not β_3 -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 53-60.
- Rodbell M. 1964. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239: 375-380.
- Saad, M.J.A., Folli, F., Kahn, J.Á., and Kahn, C.R. 1993. Modulation of insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone treated rats. *J. Clin. Invest.* 92: 2065-2072.
- Scott, A.M., Atwater., and Rojas, E. 1981. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B-cell membrane potential in single mouse islet of Langerhans. *Diabetologia*, 21: 470-475.
- Smith, C.J., Vasta, V., Degerman, E., Belfrage, P., and Manganiello, V.C. 1991. Hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase in rat adipocytes: regulation of insulin-dependent and cAMP-dependent activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266: 13385-13390.
- Spadari-Bratfisch, R.C., Santos, I.N., Vanderlei, L.C.M., and Marcondes, F.K. 1999. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77: 432-440.
- Storlien, L.H., Oakes, N.D., Pan D.A., Kusunoki, M. and Jenkins, A.B. 1993. Syndromes of insulin resistance in the rat. *Diabetes* 42: 457-462.
- Stralsfors, P., Bjorgell, P., and Belfrage, P. 1984. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylation sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3317-3321.
- Van Der Kar, L.D., Richardson-Morton, K.D., and Rittenhouse, P.A. 1991. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. *Meth. Arch. Exp. Pathol.* 14: 133-173.

- Vanderlei, L.C.M., Marcondes, F.K., Lanza, L.L.B., Spadari-Bratfisch, R.C. 1996. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot shock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 670-678.
- Verago, J.L., Grassi-Kassisse, D.M., and Spadari-Bratfisch, R.C. 2001. Metabolic markers following β -adrenoceptor agonist infusion in foot shock stressed rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (9): 1197-1207.
- Verma, S., Bhanot S., McNeill, J.H. 1999. Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. *Eur. J. Pharm.* 373: R1-R4.
- Wieland, O. 1957. Eine Enzymatische Methode zur Bestimmung von Glycerin. *Biochemische Zeitschrift*, 329: 313-319.
- Witters, L.A., and Avruch, J. 1978. Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase. *Biochemistry*, 17: 406-410.
- Wolfe, R.R., Klein, S., Carraro, F., and Weber, J. 1990. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am. J. Physiol.* 248: E382-E389.
- Yamada, F., Inoue, S., Saitoh, T., Tanaka, K., Satoh, S., and Takamura, Y. 1993. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology*, 132: 2199-2205.
- Yang, Y.T., and McElligott, M.A. 1989. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. J.* 261: 1-10.
- Yki-Jarvinen, H., Mott, D., Young, A.A., Stone, K., and Bogardus, C. 1987. Regulation of glycogen synthase and phosphorylase activities by glucose and insulin in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 80: 95-100.

III.1.1 Anexo 1

Efeito do Estresse sobre a Concentração Plasmática de Lactato

A reação de estresse desencadeada pela exposição de ratos Wistar machos a uma sessão diária de choque nas patas durante três dias determina aumento na concentração plasmática de glicose e de insulina. Além disso, adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal desses animais apresentam diminuição de sensibilidade à insulina (FARIAS-SILVA et al., 2002), à noradrenalina e ao BRL 37,344, com aumento da sensibilidade à isoprenalina e à adrenalina (FARIAS-SILVA et al., 1999). A supersensibilidade à isoprenalina e à adrenalina está associada à “up-regulation” dos adrenoreceptores β_2 enquanto a subsensibilidade à noradrenalina a ao BRL 37,344 está relacionada à diminuição dos adrenoreceptores β_1 e β_3 (FARIAS-SILVA et al., 2003).

Além de serem responsáveis pela lipólise, adipócitos também captam glicose, convertendo-a em lactato, o qual é liberado na circulação e utilizado pelo fígado no processo de neoglicogênese (CONSOLI et al., 1989; FAINTRENIE & GÉLÖEN, 1996b).

Experimentos realizados em ratos e humanos evidenciaram a importância da conversão de glicose em lactato pelos adipócitos, cuja magnitude depende do estado metabólico (CRANDALL et al., 1983; TRACKER et al., 1987; NEWBY et al., 1990; DIGIROLAMO et al., 1992). No estado de jejum, quando o organismo requer energia para os processos vitais, 60-70% da gliconeogênese hepática utiliza lactato como substrato (NEWBY et al., 1988). De acordo com PORTER e colaboradores (2002), o $\text{TNF}\alpha$, que também é sintetizado e liberado pelo tecido adiposo, aumenta a produção de lactato a partir de glicose. Porém não estão esclarecidos os mecanismos envolvidos na associação entre $\text{TNF}\alpha$ e produção de lactato.

Em quadros de resistência à insulina observa-se elevação na concentração plasmática de lactato (DeFRONZO, 1987; CONSOLI et al., 1992; VETTOR et al., 1997; CHOI et al., 2002).

Como descrito anteriormente, ratos submetidos ao estresse por choque nas patas apresentam hiperglicemia, hiperinsulinemia, e diminuição da sensibilidade à insulina (VERAGO et al., 2001; FARIAS-SILVA et al., 2002). Considerando essas alterações metabólicas, avaliamos também a concentração plasmática de lactato de ratos submetidos a três sessões de choque nas patas.

Objetivo

Avaliar o efeito do estresse por choque nas patas sobre a concentração plasmática de lactato.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com três meses de idade (250-350g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), mantidos em gaiolas coletivas acondicionadas em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas, recebendo água e ração à vontade. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (COBEA -n.º 055-1).

Estresse por choque nas patas

Os animais receberam choque nas patas ao serem colocados em uma caixa de acrílico (21X21X26 cm), cujo piso é constituído de 16 bastões de latão de 0,3 cm de diâmetro, espaçados em 1,5 cm, centro a centro. Os bastões apresentam pulsos de corrente contínua de 1,0 mA, cuja fonte de corrente é acoplada a um “scrambler”. Cada rato recebeu choques de duração de 1,0 segundo, em intervalos médios de 15 segundos (variáveis entre 5 e 25 segundos). Um disparador programável, controlado por um programa desenvolvido no Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP, determinou aleatoriamente os intervalos entre os choques. Os animais foram submetidos a uma sessão diária de 30 minutos de choques nas patas, em três dias consecutivos.

Determinação da Concentração Sangüínea de Lactato

Para a determinação da concentração sangüínea de lactato, extraímos, com capilar heparinizado, amostras de sangue da veia caudal de ratos controle e de ratos submetidos a estresse, imediatamente após a última sessão de choque nas patas. A concentração sangüínea de lactato foi determinada em fitas BM-Lactate (Roche, referência 1 543 890), submetidas à leitura em lactímetro Accusport® (Boehringer-Mannheim, Alemanha).

Resultados e Discussão

Nossos resultados mostraram que a concentração plasmática de lactato em ratos submetidos a estresse por choque nas patas é cerca de duas vezes maior que de ratos controle (Figura 1). De acordo com Barre e colaboradores (1985; 1986), patologias humanas relacionadas à insulina tais como diabetes tipo II, estão associadas com o aumento na concentração sanguínea de lactato no estado de jejum.

A evidência de que o lactato seja produzido em pequenas quantidades pelos músculos em repouso (YKI-JARVINEN et al., 1990) sugere que o tecido adiposo desempenhe papel importante na produção de precursores neoglicogênicos nesta situação. Dessa forma, pode haver aumento na produção hepática de glicose em decorrência de maior disponibilidade do lactato, como substrato neoglicogênico, causando hiperglicemia. O aumento da glicemia estimula a secreção de insulina, podendo levar à insulinemia associada a diminuição da sensibilidade à insulina (FEDERSPIEL et al., 1980; KAHN & PESSIN, 2002). Assim, o aumento na concentração plasmática de lactato em animais submetidos a estresse pode ser consequência ou causa de diminuição da sensibilidade à insulina, pois há correlação positiva entre aumento da concentração de lactato e diminuição da sensibilidade à insulina (DeFRONZO, 1987). De fato, a infusão de lactato por um período prolongado, causa resistência à insulina em tecido muscular (VETTOR et al., 1997).

Choi e colaboradores (2002) demonstraram que, em cães conscientes, a elevação da concentração plasmática de lactato suprimiu a glicólise estimulada pela insulina, antes que ocorresse diminuição da captação de glicose. Estes autores preconizam que uma deficiência metabólica precede e causa resistência à insulina em músculo esquelético, sugerindo que o lactato pode induzir resistência à insulina pela supressão do fluxo glicolítico. Dados anteriores da literatura podem validar esta hipótese. Em 1980, Pearce & Connett observaram, em músculo sóleo isolado e incubado com 8mM de lactato, diminuição da oxidação da glicose estimulada pela insulina. Clark e colaboradores (1987) verificaram a mesma resposta em músculos epitrocleares, notificando relação inversa entre a taxa de glicólise e o aumento da oxidação de lactato.

A diminuição da glicólise pelo lactato parece envolver inibição das enzimas 6-fosfofrutoquinase (PFK-1) e piruvato desidrogenase (PDH), limitantes da glicólise. Este efeito é similar ao efeito desencadeado pelos ácidos graxos (KIM et al., 1996). Em músculo cardíaco, o lactato promove aumento da concentração de citrato (inibidor da PFK-1), diminuição da concentração de frutose-2, 6-bifosfato (estimulador da PFK-1), e aumento da relação NADH/NAD, podendo inibir a PDH (DEPRE et al., 1993; 1998). Ristow e colaboradores (1997; 1999) demonstraram que deficiência da PFK-1 determina resistência à insulina, fortalecendo a hipótese de Choi et al. (2002).

Em adipócitos isolados de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, observamos diminuição da sensibilidade à insulina. Esses animais apresentam aumento da concentração plasmática de glicose, de insulina e de lactato. Estes resultados nos levam a concluir que o modelo de estresse por nós utilizado pode desencadear o quadro de resistência à insulina. Adicionalmente, parece haver diminuição da associação entre IRS-1 e PI3K nos tecidos adiposo e muscular isolados de ratos submetidos ao estresse por choque nas patas. No entanto, estes resultados são preliminares e investigações complementares serão realizadas.

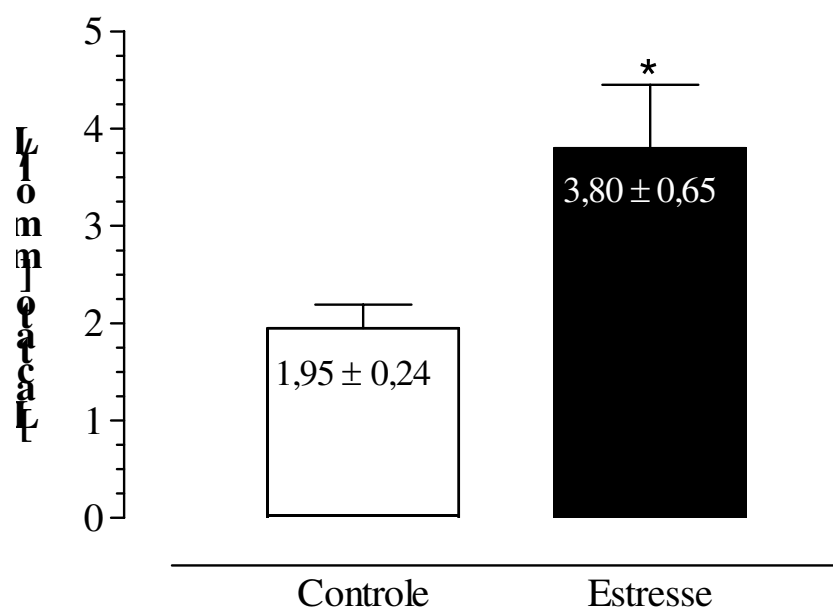


Figura 1. Concentração plasmática de lactato (mmol/ L) de ratos controle e de ratos submetidos a três sessões de estresse por choque nas patas (n=4). * diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$, teste t de Student).

III.2. Capítulo 2

Trabalho apresentado, sob a forma de pôster, no “Eighth Symposium on Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress”, realizado no Smolenice Castle - República da Eslováquia, de 28 de junho a 3 de julho de 2003, com o resumo publicado no periódico “Endocrine Review” e submetido à publicação no periódico “Annals of the New York Academy of Sciences”.

Glucocorticoid receptor and beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats

Elisângela Farias-Silva, Iraídes Nunes dos Santos, Maria E.

C. Amaral, Dora M. Grassi-Kassisse and Regina C. Spadari-Bratfisch

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Running Title: Glucocorticoid receptors and β -adrenoceptors in stressed rats.

Abstract

Adipocytes isolated from epididymal adipose tissue of foot shock stressed rats are supersensitive to isoprenaline and subsensitive to norepinephrine. These alterations are probably mediated by a stress-induced increase in plasma corticosterone levels. The purpose of this work was to investigate whether foot shock stress modifies the expression of glucocorticoid (GR) and β -adrenergic protein (β -AR) receptors in epididymal adipose tissue from rats submitted to one daily foot shock session on three consecutive days. This stress protocol caused a decrease in GR, β_1 -AR and β_3 -AR protein levels, but increased β_2 -AR. These results confirm and support previous functional studies. The alterations in proteins expression may be modulated by the high corticosterone levels that also down-regulate the glucocorticoid receptor.

Key words: white adipose tissue, stress, β -adrenoceptor, corticosterone, glucocorticoid receptor

Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Acknowledgements: The authors thank to Dr. A. C. Boschero for allowing the use of his laboratory and Dr. S. Hyslop for the editing manuscript.

Introduction

The lipolytic response to catecholamines in rat white adipocytes is essentially dependent on β_1 -AR and β_3 -AR, especially the β_3 -AR subtype. In contrast, the β_2 -AR represents a very small proportion of the β -AR population so that under physiological conditions this subtype is probably not implicated in the stimulation of lipolysis¹. However, adipocytes from foot shock stressed rats are supersensitive to isoprenaline (ISO) and epinephrine (EPI), and subsensitive to norepinephrine (NE) and BRL37344². ICI118,551, a selective β_2 -AR antagonist, has no effect on the response to ISO in adipocytes from control rats, but abolishes the supersensitivity to isoprenaline in adipocytes from stressed rats. Similar results have been obtained for cardiac tissue isolated from rats exposed to the same stressor agent^{3,4}.

Alterations in glucocorticoid receptor (GR) expression have been described in many tissues from rats subjected to different stress protocols that increases plasma corticosterone levels⁵. In this study, we examined the impact of foot shock stress on β_1 -, β_2 -, β_3 -AR and GR protein levels in epididymal adipose tissue from control and stressed rats.

Material and methods

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, 250-350 g) were housed and cared for in accordance with the experimental protocols that were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEAE - certificate number 0555-1) of the Institute of Biology, UNICAMP. The stress protocol has been described elsewhere and consisted of one daily foot shock session applied on three consecutive days².

Tissue preparation

The rats were sacrificed by a blow to the back of the head and exsanguinated immediately after the last stress session. Epididymal white adipose tissue was dissected out and stored at -70°C until used. The tissues were homogenized in a solubilization buffer of the following composition: 100 mM Tris base, 10 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 10% sodium

dodecil sulphate (SDS), in a boiled water bath, using an Ultra Turrax[®] homogenizer (Ika Works Inc., Wilmington, NC, USA) operate at maximum speed for 30 s. The samples were maintained in a boiling water bath for 10 min and then centrifuged for 40 min at 13000g and 4°C. The protein content was measured with a standard micro BCA reagent (Pierce, IL, USA). The samples were treated according to Laemmli⁶ and heated in a boiled water bath for 5 min. For the analysis, aliquots of each sample (50 µg and 100 µg of protein, for the GR and β-AR blots, respectively) were resolved by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels, electrotransferred to nitrocellulose membranes, and incubated overnight at 4°C with polyclonal antibodies against GR, β₁, β₂- or β₃-AR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA). The bands recognized using GR antibody were visualized by ECL chemiluminescence substrate solution (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and then exposed to Amersham X-ray film. To detect the β-AR subtypes, the blots were incubated with 2 µCi of [¹²⁵I]-protein A (30 µCi/g) in 10 ml of blocking buffer for 1 h at room temperature. The membranes were then stored in contact with preflashed Kodak X-ray film at -70 °C for 20 days. The optical density of the GR (~ 95 kDa) or β-AR (~ 47 kDa) bands on the X-ray film was analyzed using Gel-Pro Software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Statistical analysis

The differences in receptor expression between groups were assessed using Student's *t*-test for unpaired samples. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

In epididymal adipose tissue from stressed rats there was a decrease of approximately 70% and 12% in the β_1 -AR and β_3 -AR protein levels, respectively. In contrast, the level of β_2 -AR protein increased by 27% in adipocytes from stressed compared to control rats ($p < 0.05$). The levels of GR decreased 94% in adipocytes from rats subjected to foot shock stress compared to control animals (Figure 1).

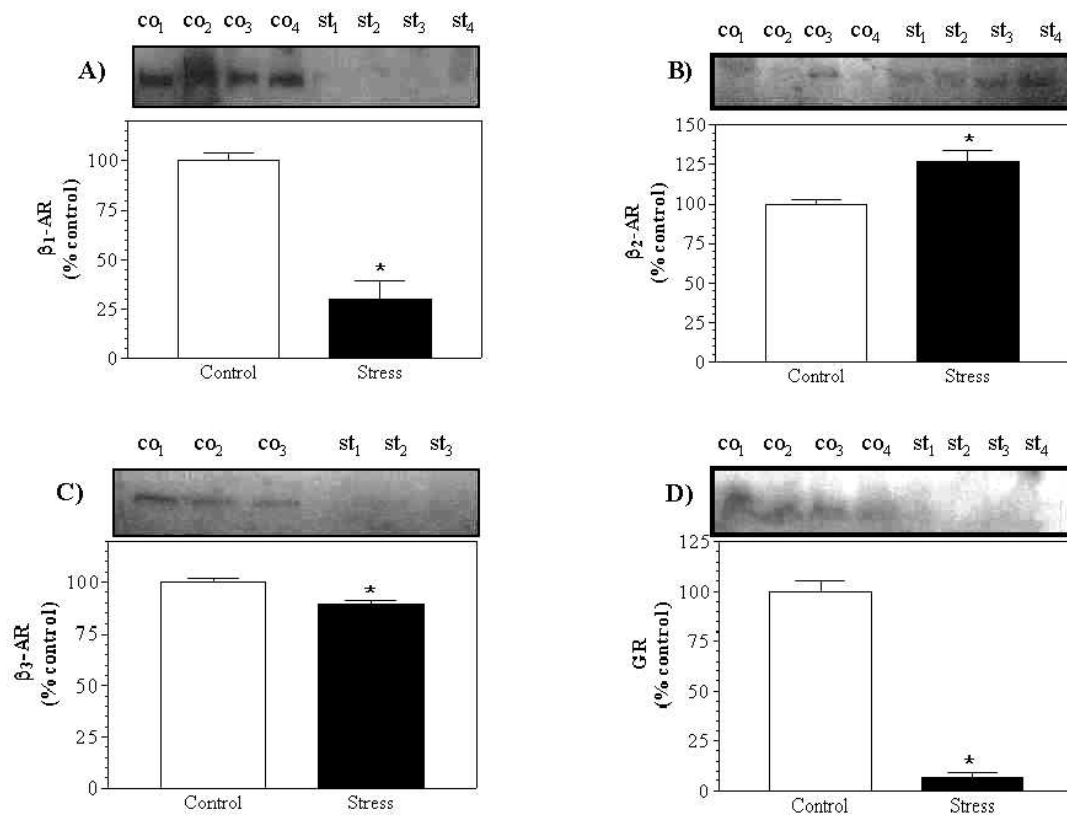


Figure 1 – Representative Western blots of β_1 -AR (A), β_2 -AR (B), β_3 -AR (C) and GR (D) in epididymal adipose tissue from control (co) and stressed (st) rats. In stressed rats, tissue was collected immediately after the third foot shock session. The plots represent the percentile of the control optical density (mean $\pm$ SEM of 4 experiments).

Discussion

In this study, we examined the effect of stress on GR and β -AR expression in rat epididymal adipose tissue. The white adipose tissue consist of 2-3% of proteins, 5-30% water and 60-80% lipids. Thus to perform western blot, in adipose tissue, especially for β -AR, we used a protocol designed to concentrate the samples in order to obtain enough protein by using a specific buffer, increasing the centrifugation time, and prolonging the lenght of exposure to the X-ray film, as described in Material and Methods. With those methodological adaptations, the western blots were obtained that are shown in Figure 1. β_2 -AR levels increased after three foot shock sessions whereas those of β_1 -AR and β_3 -AR decreased.

Adipocytes² and cardiac tissue^{3,4} obtained from foot shock stressed rats show supersensitivity to ISO, EPI and TA2005 that is abolished by the β_2 -AR antagonist ICI118,551. The supersensitivity to non-selective β -AR agonists or selective agonists for β_2 -AR is also abolished by treating the rats with RU38484, a compound that blocks the glucocorticoid receptor, before exposure to stress⁷. Glucocorticoids are known to stimulate β_2 -AR in white adipose tissue while inhibiting the expression of β_1 -AR and β_3 -AR^{8,9}. In agreement with these results, the rate of transcription of β_2 -AR is increased in response to β -agonist stimulation of the receptor at the cell surface. This positive autoregulation of the β_2 -AR gene occurs through receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase, with consequent activation of cAMP responsive element binding (CREB) and stimulation of β_2 -AR gene transcription¹⁰. Cardiac tissue is also subsensitive to NE^{3,4} whereas the adipocytes are subsensitive to NE and BRL37344², which agrees with the present results showing a decrease in β_1 -AR and β_3 -AR protein levels.

Our results also showed a reduction in GR protein levels in adipose tissue from stressed rats compared to control rats. Glucocorticoids can modulate their own receptor^{11,12} since changes in GR levels have been reported in tissues from rats subjected to a long-term elevation or reduction in the circulating levels of corticosterone¹³. Adrenalectomy increases the number of cytosolic GR and the percentage of GR translocated to the nucleus¹⁴. However, large doses of glucocorticoids reduce the cytosolic GR levels¹⁵.

Rats submitted to the foot shock stress protocol used here present a 50% increase on plasma corticosterone levels¹⁶.

Concluding, the present results confirm our previous data and suggest that there is a compensatory mechanism involved in the regulation β -AR and GR expression that is dependent on the levels of glucocorticoids. Variations in receptor expression can modify the control of lipolysis in response to stress. Considering that the adipocytes isolated from stressed rats are also subsensitive to the antilipolytic effect of insulin¹⁷, those results confer physiological importance to this mechanism on the control of adipocytes metabolism under stress.

References

1. Langin, Det al. 1991. Coexistence of three beta-adrenergic receptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 191-301.
2. Farias-Silva, E. et al. 1999. Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J. Lipid. Res.* 40:1719-1727.
3. Vanderlei, L. C. M. et al. 1996. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in rat atria from rats submitted to foot shock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 670-678.
4. Marcondes, F. K. et al. 1996. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous-cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 7-13.
5. Kant, G.J. et al. 1987. Effects of chronic stress on plasma corticosterone. *Physiol. Behav.* 40: 775-779.
6. Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
7. Nourani, F. R. R., R. C. Spadari & S. De Moraes. 1992. Foot shock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.* 23: 787-791.

8. Evans, B. A. et al. 1998. Differential regulation of β_3 -adrenoceptors in gut and adipose tissue of genetically obese (ob/ob) C57BL/6J. *Br. J. Pharmacol.* 124: 763-771.
9. Bakipanos, E. & J.E. Silva. 2002. Opposing effects of glucocorticoids on β_3 -adrenergic receptor expression in HIB-1B brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 190: 29-37.
10. Collins, S. et al. 1990. A cAMP response element in the β_2 -adrenergic receptor gene confers transcriptional autoregulation by cAMP. *J. Biol. Chem.* 265: 19330-19335.
11. Deak, T. et al. 1999. Long-term changes in mineralocorticoid and glucocorticoid receptor occupancy following exposure to an acute stressor. *Brain Res.* 847: 211-220.
12. McEwen, B. S., E. A. Gould & R. R. Sakai. 1992. The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress. *Br. J. Psych. (Suppl.)* 2: 18-23.
13. Scribner, K. A. 1991. Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology* 120: 99-108.
14. Al-Mohaisen M., A. Cardounel & M. Kalimi. 2000. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. *Steroids* 65: 8-15.
15. Alexandrova, M. & P. Farkas. 1992. Stress-induced changes of glucocorticoid receptor in rat liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42: 493-498.
16. Verago, J. L., D. M. Grassi-Kassisse & R. C. Spadari-Bratfisch. 2001. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in foot shock stressed rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 1197-2001.
17. Farias-Silva, E. et al. 2002. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats sbmitted to foot shock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 783-789.

III.3. *Capítulo 3*

Trabalho apresentado, sob a forma de pôster, no “no “XIIIth International Congress of Pharmacology”, realizado em Munique - Alemanha, de 26 a 31 de julho de 1998, e será submetido à publicação em periódico especializado.

Decreasing on food intake in foot-shock stressed rats is not linked to leptin levels.

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

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de
Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas, SP – Brasil.

Runing Title: Stress, food intake and leptin levels

Abstract

Stress has been shown to reduce food intake. However, the interplay between glucocorticoids, insulin and leptin controlling food intake is still controversial. The selective β_3 adrenergic agonist BRL 37,344 produces a dose-dependent reduction on food intake when administered in the third ventricle and peripherally. In the present work, we investigated the feeding behavior, insulin and leptin plasma concentration in fed, fasted and fast-refeed Wistar rats submitted to foot-shock stress in the absence or in the presence of peripherally administered BRL 37,344. In fed rats, serum leptin levels were not altered by stress whereas insulin levels were increased. After an overnight fasting serum levels of leptin and insulin were lower than those of control fed rats. Stress determined an increase in serum levels of leptin and insulin in fasted rats. Refeeding did not alter leptin levels but increased insulin levels above those seen in fed control rats. Refeeding plus stress caused an additional increase in insulin as well as increased leptin levels. Treatment of control rats with BRL37,344 did not alter serum leptin levels but reduced insulin levels although had no effect on food intake. Feeding behavior was not significantly modified by 30 nmol/ml of BRL 37,344 in control rats. In stressed rats, BRL 37,344 reduced food intake, serum leptin and insulin levels. We conclude that the effect of stress on serum leptin levels depends on the nutritional state (fed vs. fasted) whereas insulin is more affected by feeding than by stress. BRL37,344, a β_3 -adrenoceptor agonist administered peripherally to control rats did not alter the leptin levels or feeding behavior but caused a decrease in serum insulin levels. Stressed rats are more sensitive to the effect of BRL37,344 on serum leptin levels and feeding behavior. The low food intake observed in stressed rats is not mediated by leptin. If changes in metabolites such as glucose or free fatty acids are associated to the stress-induced hypophagia remains to be determined.

Key Words: stress; leptin; food intake; insulin; β_3 -adrenoceptor agonist

Introduction

It has been described that the chronic exposure to stressors of a certain severity causes anorexia (Krahn et al., 1990), decreases food intake, reduces body weight and induces adrenal hypertrophy (Giralt et al., 1987; Krahn et al., 1990; Hotta et al., 1991; Martí et al., 1994; Farias-Silva et al., 1999). Rats submitted to three foot-shock sessions showed a reduction on body weight and an increase on basal lipolysis (Farias-Silva et al., 1999). Weight loss and food intake decreasing in rats exposed to stress is well established, with this specific feeding effect being modulated by the intensity, duration, frequency or time of the day that it is applied (Martí et al., 1994; Vallès et al., 2000). The mechanisms responsible for this decrease in food intake have not been elucidated and it seems to be complex.

The hormonal and neuroendocrine systems that regulate energy balance include leptin and insulin. Leptin is related to the abundance of body fat, thereby coupling feeding behavior, metabolism and endocrine physiology to the nutritional state (Frühbeck et al., 1998). Insulin and leptin represent “adiposity signals” (Porte and Woods, 1981; Frühbeck et al., 1998) that decrease the expression of hypothalamic NPY, which triggers feeding behavior (Baskin et al., 1999).

The regulation of the energy balance is also under control of catecholamines interacting with the β_3 -adrenergic receptor subtype (Lowell and Flier, 1995; Giacobino, 1995; Lowell et al., 1996). These receptors are expressed in brown and white adipose cells (BAT and WAT, respectively) where they are coupled to cAMP generation (Giacobino, 1995). Agonists selective for the β_3 -adrenergic receptor stimulate energy expenditure, activate BAT function, and promote lipolysis in WAT (Arch et al., 1984; Holloway et al., 1992; Bloom et al., 1992). Variations in the sequence of the human β_3 -adrenergic receptor gene are associated with decreased energy expenditure, abdominal obesity, and insulin resistance (Arner, 1995; Clement et al., 1995; Waltson et al., 1995). It has also been observed that treatment of rodents with β_3 -adrenergic agonists produces a dose-dependent reduction on food intake (Himms-Hagen et al., 1994; Tsujii and Bray, 1992, 1998) despite reducing leptin levels (Mantzoros et al., 1996). Activation of β_3 -adrenoceptors is associated to the decrease of leptin expression and circulating levels (Li et al., 1997).

Adipocytes isolated from rats submitted to foot-shock stress are supersensitive to the lipolytic effect of epinephrine and isoprenaline (Farias-Silva et al., 1999) due to an increase on β_2 -adrenoceptors expression (Farias-Silva et al., 2003). Moreover, adipocytes are subsensitive to norepinephrine and to BRL37,344, due to a decreased expression on β_1 - and β_3 -adrenoceptors, respectively (Farias-Silva et al., 2003). Adipocytes from foot-shock stressed rats are also subsensitive to the anti-lipolytic effect of insulin (Farias-Silva et al., 2002). Additionally, rats submitted to foot-shock stress presents high plasma levels of corticosterone, glucose and insulin (Verago et al., 2001; Farias-Silva et al., 2002)

In the present work, we measured the serum levels of leptin and insulin in foot-shock stressed rats. The effect of BRL37,344 on serum leptin and insulin levels as well as feeding behavior were also investigated in feed, fasted and fast-refeed rats submitted to stress.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 250 to 350 g at the beginning of the experiments were used. The animals were housed in individual cages (30 x 18 x 20 cm) in a temperature-controlled room (22°C), on a 12 h light/dark cycle with lights on at 6:30 a.m. Standard laboratory chow and tap water were available *ad libitum*. During the experiments, the animals were cared for in accordance with the principles for the use of animals in research and education, as laid down in the Statement of Principles, adopted by the FASEB Board. The experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (COBEA, certificate number 0555-1).

Stress procedure

Each rat underwent one daily session of unsignaled, inescapable foot shocks in three consecutive days. The animals were placed into a Plexiglas chamber (26 x 21 x 26 cm) provided with a grid floor made of stainless-steel rods (0.3 cm in diameter and spaced 1.0 cm apart). During the 30 min sessions, which occurred between 7:30 a.m. and 11:00 a.m., the foot shocks were delivered by a constant current source controlled by a microprocessor-based instrument constructed at the University's Biomedical Engineering Center. The current intensity was 1.0 mA with duration of 1.0 s at random intervals of 5-25 s (mean interval of 15 s). The rats were returned to their cages at the end of each foot shock session.

Experimental protocols

Fed control and stressed rats:

Daily food intake was measured in fed control (CO) and stressed (ST) rats during the three days that rats were submitted to foot shock sessions. After the last session, the animals were sacrificed by a blow to the head and bleeding. Blood samples were collected for serum leptin and insulin measurement.

Fast control and stressed rats:

Before the last foot shock session, the rats were fasted (F) overnight but had free access to water. In the next morning, stressed rats were submitted to the last foot shock session. Control rats were fasted in the night before sacrifice. Control (FCO) and stressed (FST) fasted rats were sacrificed by a blow to the head and blood samples were collected for serum leptin and insulin levels assays.

Fast-refeed control and stressed rats:

Control and stressed rats were fasted overnight as above described. In the following morning fasted-stressed rats were submitted to the last foot shock session. After that, control and stressed rats received an intraperitoneal injection (0.1 ml/ 100g of body weight) of saline (0.9%) or BRL 37,344 (30 nmol/ml) (Tsuji and Bray, 1998). Following injections, rats returned to their individual cages and were provided with chow (fast-refeed, FR-rats). Food intake was measured after 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h and 6 h. Animals were distributed in groups as following: fast-refeed control treated with saline (FRCO-SAL) or BRL 37,344 (FRCO-BRL); and fast-refeed stressed treated with saline (FRST-SAL) or BRL 37,344 (FRST-BRL). After the sixth hour, rats were sacrificed and blood collected for serum leptin and insulin measurement.

Serum Leptin

Serum leptin levels were assayed in duplicated, using Mouse Leptin ELISA kit (Crystal Chem Inc., Chicago, IL, USA).

Serum Insulin

Serum insulin levels were assayed in duplicated, using radioimmunoassay as previously described (Farias-Silva et al, 2002).

Statistical Analysis

The results were expressed as means $\pm$ SEM. Data of food intake, serum leptin and serum insulin levels were compared by Student's t test or ANOVA plus Tukey's test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Rats submitted to three foot-shock sessions reduced body weight and food intake (Figure 1), confirming previously reported data (Farias-Silva et al, 1999). Leptin serum levels were not different between control and stressed rats (Table 1; Figure 1B), but insulin serum levels were higher in stressed than control rats (Table 1, Figure 1C).

After an overnight fasting, control rats show a decrease in the serum leptin and insulin levels (Table 1), but in stressed rats the leptin and the insulin levels were similar to those of fed control rats and higher than fast control rats (Table 1; Figure 2). Therefore, stress cancelled the decrease in the serum leptin and insulin levels induced by fasting. Moreover, the stress-induced increase in serum insulin levels was preserved in fasted rats.

Figure 3 shows in the panel A the food intake 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h after the third foot-shock session, when rats were allowed free access to food, after an overnight fasting. Control rats received the same treatment but were not submitted to foot-shock stress. Some rats received 30 nmol BRL37344 before the refeeding period.

Refeeding did not alter the serum leptin levels in control rats but in stressed rats induced a decrease to levels similar to those seen in control rats. BRL37,344 administered before the refeeding period did not alter the serum leptin levels of control rats but induced an additional decrease in the serum leptin levels of stressed rats (Figure 3B). Serum insulin levels were higher after stress in fed (Figure 1) and fasted rats (Figure 2). Refeeding increased the serum insulin levels in both control and stressed rats with the levels higher in stressed than control rats. BRL37,344 lowered insulin levels in both control and stressed rats at similar levels (Figure 3C).

There was no difference in the total food intake measured during the 6 hours period by foot-shock stressed rats compared to control (FRCO-SAL: 9.2 ± 0.5 g vs. FRST-SAL: 8.3 ± 0.6 g, $p > 0.05$). BRL 37,344 (30 nmol) induced no change in control rats food intake (9.0 ± 0.6 g; Figure 3A). However, BRL37,344 administered to stressed rats caused a significant decrease in the food intake (7.0 ± 0.5 g; Figure 3A).

Table1. Serum leptin and insulin levels of fed, fast and fast-refeed control and stressed rats.

	Leptin (ng/ml)		Insulin (ng/ml)	
	CO	ST	CO	ST
Fed	2.43 ± 0.51 ^a (8)	2.86 ± 0.50 ^a (8)	1.16 ± 0.07 ^d (8)	2.99 ± 0.63 ^e (8)
Fast	0.98 ± 0.16 ^b (8)	3.01 ± 0.40 ^a (3)	0.53 ± 0.10 ^f (8)	1.16 ± 0.29 ^d (3)
Fast-refeed saline	1.14 ± 0.32 ^b (9)	1.20 ± 0.21 ^b (9)	1.57 ± 0.13 ^d (9)	2.51 ± 0.43 ^e (9)
Fast-refeed BRL 37344	0.92 ± 0.16 ^b (7)	0.43 ± 0.10 ^c (6)	0.62 ± 0.12 ^f (7)	0.89 ± 0.19 ^{d,f} (6)

Values are means ± SEM . Different letters indicates that groups are significantly different from each other (ANOVA plus Tukey test).

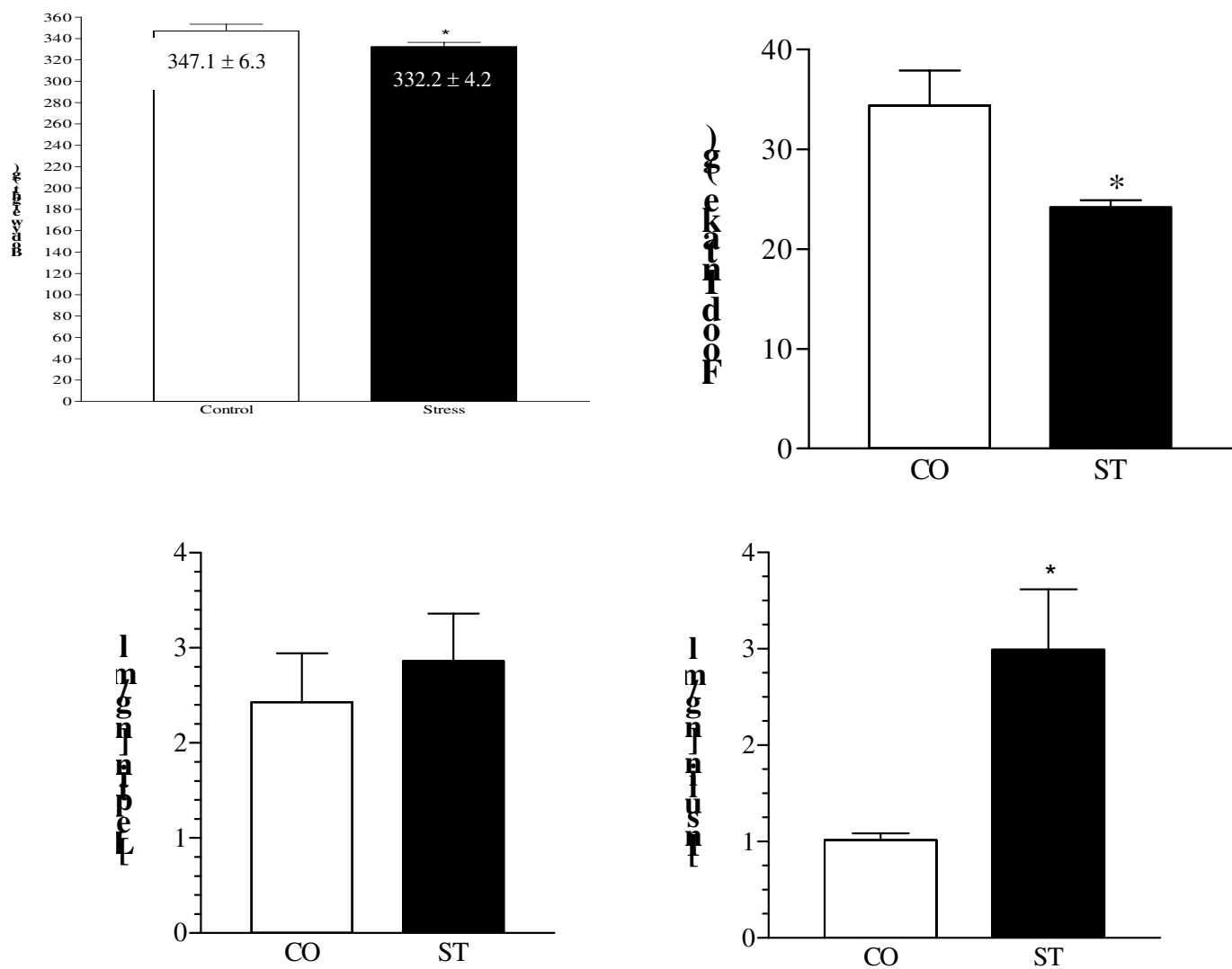


Figure 1. Body weight, daily food intake, serum leptin and insulin levels of control (CO) and foot shock stressed (ST) rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM of 8 experiments for each group. * significantly different from control ($p < 0.05$, Student's t test).

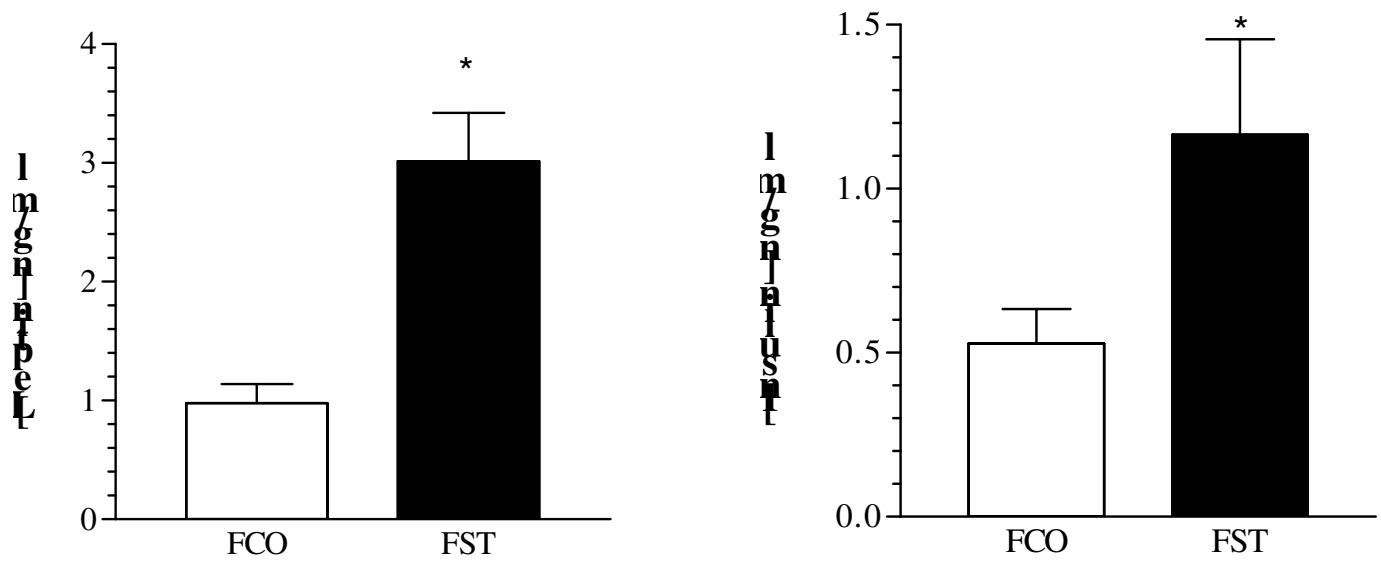


Figure 2. Serum leptin and insulin levels (ng/ml) of fasted control (FCO) and foot shock stressed (FST) rats. Data are expressed as means $\pm$ SEM. The number of experiments was 8 for the control and 3 for the stressed group. * significantly different from control ($p < 0.05$, Student's t test).

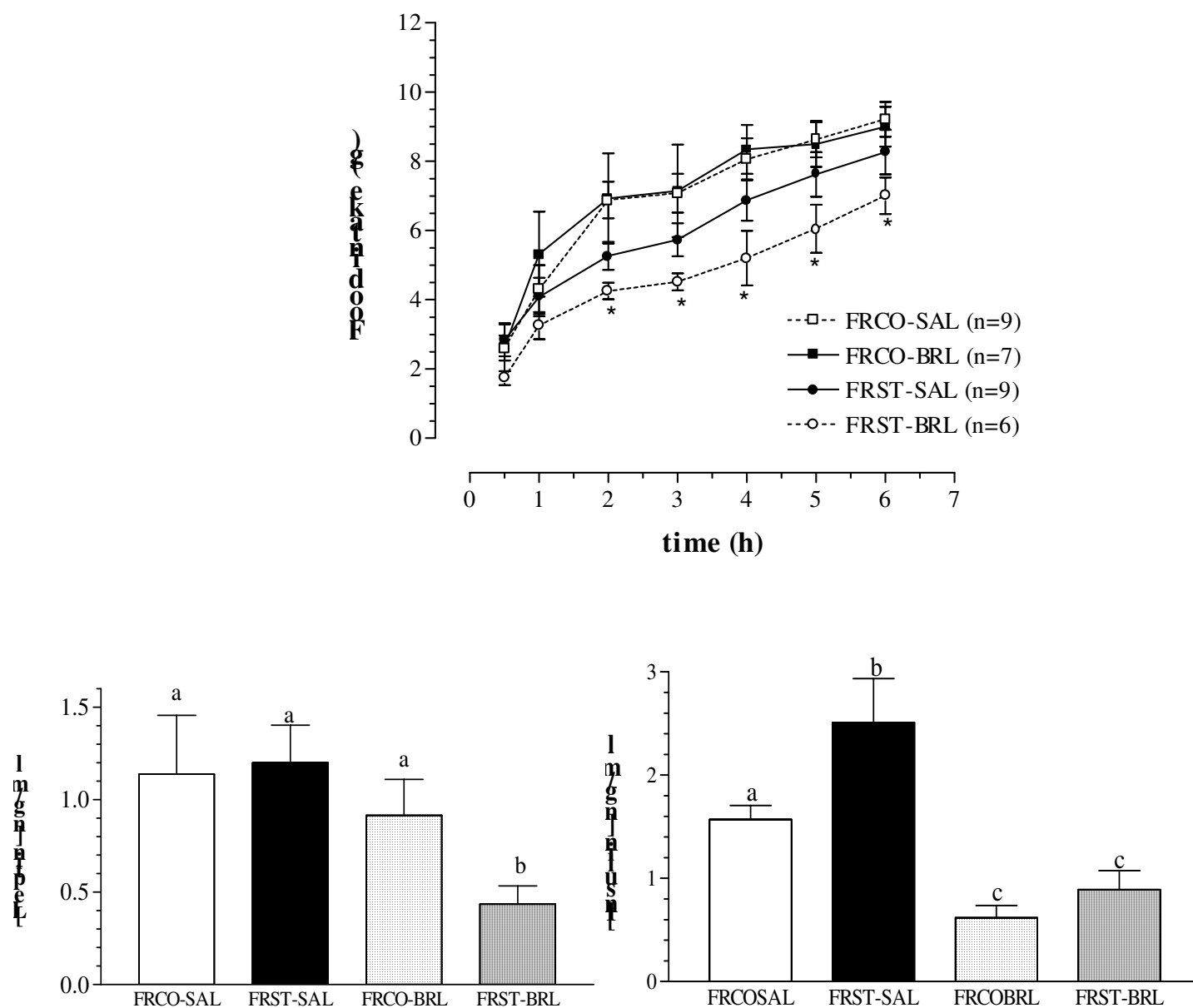


Figure 3. Effect of BRL37344 (30 nmol) on food intake, serum leptin and insulin levels of control (CO) and foot shock stressed (ST) overnight fasted rats, after six hours of refeeding. Different letters means statistical difference ($p < 0.05$, ANOVA plus Tukey's test).

Discussion

The results presented here showed that in fed stressed rats the leptin levels are similar to control, but insulin levels are higher in stressed than control fed rats, confirming previously reported data (Farias-Silva et al, 2002). Present data also confirmed that stressed rats loose by around 4,5 % body weight and reduced total daily food intake by 30 % (Farias-Silva et al, 1999).

After an overnight fasting, non-stressed rats had serum leptin and insulin levels lower than fed rats. Reduced serum leptin levels during short-term periods of fasting or energy intake restriction independently of modest changes of the body fat content have been previously reported (Boden et al., 1996; Weigle et al., 1997; Keim et al., 1998; Dubuc et al., 1998). Insulin is considered to be a potent regulator of leptin, because plasma insulin concentration decreases during fast and increase after refeeding in parallel with plasma leptin levels (Trayhurn et al., 1995). However, in fasted stressed rats the serum leptin levels were similar to those of fed non-stressed rats whereas insulin levels were higher than those of fasted non-stressed rats but lower than those of fed rats. Glucocorticoids have been shown to stimulate the *ob* gene expression and leptin secretion in vivo in humans or rats as well as in vitro in primary culture cells (Sinha et al., 1996; Considine et al., 1997). Nevertheless, insulin completely blocks the glucocorticoid-stimulated increase in leptin release and *ob* mRNA in isolated human subcutaneous adipocytes (Considine et al., 1997; Reul et al., 1997). This would explain why the serum levels of leptin are lower in stressed rats after the refeeding period whilst serum insulin levels are high. Low levels of leptin have been previously reported in rats submitted to repeated restraint stress (Harris et al., 2002). The data presented here show that in vivo, in stressed rats, the combined effect of high plasma levels of glucocorticoids, insulin and catecholamines (Verago et al., 2001; Farias-Silva et al. 2002) on serum leptin levels remain controversial.

It is known that the sympathetic nervous system acts specifically through β_3 -adrenoceptors to regulate leptin levels during stress (Sandoval and Davis, 2003) and that β_3 -adrenergic agonists inhibit the leptin secretion (Li et al., 1997). Tsujii and Bray (1998)

showed that BRL 37,344 promoted a dose-dependent decrease on food intake in female Zucker obese and lean rats, and that this agonist acts central and peripherally. The results presented here show that there was no alteration in the leptin levels or food intake of male Wistar control rats in a six hours period following intra-peritoneal administration of 30 nmol BRL37,344, the same dose used by Tsujii and Bray (1998). This difference in the results might be caused by the rat strain or gender, with male Wistar rats being less sensitive to the effect of BRL37,344 on food intake than female Zucker rats. Differences on the effect of BRL37,344 were found to vary with the diet and strain of mice (Collins et al., 1997) and with rats nutritional state (Tsujii and Bray, 1998).

At the end of the refeeding period, control rats treated or not with BRL37,344 showed no alteration in the serum leptin levels. However, refeeding decreased the serum leptin levels in stressed rats. This effect was potentiated by the rats treatment with BRL37,344.

The stress reaction is characterized by high plasma levels of catecholamines (Axelrod and Reisine, 1984) and glucocorticoids (Axelrod and Reisine, 1984; Verago et al., 2001). We have already shown that plasma corticosterone levels are high after the foot shock session (Verago et al., 2001). In this case, stressed rats which received BRL37,344, were exposed to higher stimulation of the β_3 -adrenoceptors, which effect might be additionally potentiated by corticosterone, causing lower plasma leptin levels.

Tsujii and Bray (1998) suggest that there are several possible locations where β_3 -adrenoceptors suppress food intake. Himms-Hagen (1995) has recently proposed that the initiation and inhibition of food intake might be related to the effects of β_3 -adrenoceptor agonists on brown adipose tissue, which is richly supplied with β_3 -adrenoceptors because damage to this tissue in transgenic animals leads to weight gain and susceptibility to obesity induced by high fat-diet (Hamann et al., 1996). β_3 -adrenoceptors have also been identified in the fundus of the stomach, in the longitudinal and circular smooth muscle of both colon and ileum, and in the colonic submucosa (Pelleymounter et al., 1995; Tsujii and Bray, 1998). Afferent signals from the gut to the brain are an important part of the satiety system (Bloom et al., 1992; Clement et al., 1995). Stimulation of β_3 -adrenoceptors in the gut is involved in gastric acid secretion (Vallès et al., 2000) and may be involved in

modulating food intake (Tsujii and Bray, 1998). Our data do not allow to identify in which of these locations BRL37,344 was effective lowering food intake in stressed rats, but they show that the effect is not mediated by increase in the serum leptin levels.

One alternative possibility would be the plasma levels of metabolites. The plasma levels of glucose are high after the third foot-shock stress session whereas triacylglycerol was higher after the first foot-shock session but are similar to control levels after the second and the third sessions (Verago et al., 2001). Modifying fatty acid oxidation is known to affect food intake (Scharrer and Langhans, 1986). The serum levels of free fatty acids were not evaluated in this stress model. However, adipocytes isolated from foot-shock stressed rats show increased basal lipolysis as well as supersensitivity to adrenaline (Farias-Silva et al., 1999), both factors that would contribute to increased free fatty acids availability.

We conclude that the effect of stress on serum leptin levels depends on the nutritional state (fed vs. fasted) whereas insulin is more affected by feeding than by stress. BRL37,344, a β_3 -adrenoceptor agonist, administered peripherally to control rats, did not alter the leptin levels or feeding behavior but caused a decrease in serum insulin levels. Stressed rats are more sensitive to the effect of BRL37,344 on serum leptin levels and feeding behavior. The low food intake observed in stressed rats is not mediated by leptin. If changes in metabolites such as glucose or free fatty acids are associated to the stress-induced hypophagia remains to be determined.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, for supporting this research.

References

Arch, J.R.S.; Ainsworth, M. A.; Cawthorne, M. A.; Piercy, V.; Senitt, M. V.; Thody, V. E.; Wilson, C.; Wilson, S. Atypical beta-adrenoceptors on brown adipocytes as targets for antiobesity drugs. *Nature* 309:163-165, 1984.

Arner, P. The β_3 -adrenergic receptor: a cause and cure of obesity? 333:382-383, 1995.

Axelrod, J.; Reisine, T.D. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*. 224 (4648): 452-459; 1984.

Baskin, D.G.; Figlewicz, L. D.; Seeley, R. J.; Woods, S. C.; Porte, D.Jr.; Schwartz, M. W. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for regulation of food intake and body weight. *Brain Res.*, v. 848, p. 114-123, 1999.

Bloom, J. D.; Dutia, M. D.; Johnson, B. D.; Wissner, A.; Burns, M. G.; Largis, E. E.; Dolan, J. A.; Claus, T. H. CL 316,243: a potent beta-adrenergic agonist virtually specific for beta 3 receptors: a promising antidiabetic and antioesity agent. *J. Med. Chem.* 35:3081-3084, 1992.

Boden, G.; Chen, X.; Mozzoli, M.; Ryan, I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3419-3423, 1996.

Clement K.; Vaisse, C.; Manning, B. S. J.; Basdevant, A.; Guy-Grand, B.; Ruiz, J.; Silver, K. D.; Shuldiner, A. R.; Froguel, P.; Strosberg, A. D. Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N. Engl. J. Med.* 333:352-354, 1995.

Collins, S.; Daniel, K. W.; Petro, A. E.; Surwit, R. S. Strain-specific response to beta3-adrenergic agonist treatment of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology* 138 (1): 405-413, 1997. et al., 1997

Considine, R. V.; Nyce, M. R.; Kolaczynski, J. W.; Zhang, P. L.; Ohannesian, J. P.; Moore Jr, J. H.; Fox, J. W.; Caro, J. F. Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. *J Cell Biochem* 1997; 65: 254-258, 1997.

Dubuc, G. R.; Phinney, S.D.; Stern, J. S.; Havel, P. J. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism* 47:429-434, 1998.

Farias-Silva, E.; Sampaio-Barros, M. M., Amaral, M. E. C.; Carneiro, E. M.; Boschero, A. C.; Grassi-Kassisse, D. M.; Spadari-Bratfisch, R. C. Stress-induced insulin subsensitivity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (8): 783-789, 2002.

Farias-Silva, E.; Santos I. N., Amaral M. E. C., Grassi-Kassisse, D. M., Spadari-Bratfisch, R. C. Glucocorticoid receptor (GR) and beta-adrenoceptors (β -AR) in epididimal adipose tissue from stressed. *Endoc. Regulations*, v. 37, n. 2, p. 97, 2003.

Farias-Silva, E.; Wolf-Nunes, V.; Grassi-Kassisse, D. M.; Spadari-Bratfisch, R. C. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β -adrenoceptor agonist in rat white adipocytes. *J. Lipid Res.* 40:1719-1727, 1999.

Frühbeck, G.; Jebb, S. A.; Prentice, A. M. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin. Physiol.* 18: 399-419, 1998.

Giacobino, J. P. Beta 3 adrenergic receptor: an update. *Eur. J. Endocrinol.* 132:347-385, 1995.

Giralt, M.; García-Márquez, C.; Armario A. Previous chronic ACTH administration does not protect against the effects of acute or chronic stress in male rats. *Physiol. Behav.* 40:165-170; 1987.

Hamann, A.; Flier, J. S.; Lowell, B. B. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* 137 (1): 21-29, 1996.

Harris, R. B.; Mitchell, T. D.; Simpson, J.; Redmann, S. M. Jr.; Youngblood, B. D.; Ryan, D. H. Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 282 (1): R77-R88, 2002.

Himms-Hagen, J.; Cui, J.; Danforth, E.; Taatjes, D. J.; Land, S. S.; Waters, B. L.; Claus, T. H. effect of CL 316,243, a thermogenic beta 3 agonist, on energy balance and brown and white adipose tissue in rats. *Am. J. Physiol.* 266:R1371-R1382, 1994.

Himms-Hagen, J. Role of brown adipose tissue thermogenesis in control of thermoregulatory feeding in rats: hypothesis that links thermostatic and glucostatic hypotheses for control of food intake. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208 (2): 159-169, 1995.

Holloway, B. R.; Howe, R.; Rao, B. S.; Stibling, D. ICI D 7114: a novel selective adrenergic receptor agonist in brown fat and thermogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:S262-S264, 1992.

Hotta, M.; Shibasaki, T.; Yamauchi, N.; et al. The effects of chronic central administration of corticotropin-releasing factor on food intake, body weight, and hypothalamic-pituitary-adrenocortical hormones. *Life Sci.* 48: 1483-1491; 1991.

Keim, N. L.; Stern, J. S.; Havel, P. J. Relation between circulating leptin concentration and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:794-801, 1998.

Krahn, D. D.; Gosnell, B. A.; Majchrzak, M. J. The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. *Biol. Psychiatry* 27:1094-1102; 1990.

Li, H.; Matheny, M.; Scarpace, P.J. Beta 3-adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. *Am. J. Physiol.* 272:E131-E1036; 1997.

Lowell, B. B.; Flier J. S. The potential significance of β_3 adrenergic receptors. *J. Clin. Invest.* 95:923, 1995.

Lowell, B. B.; Susulic, V.; Hammann, A.; Lawitts, J. A.; Himms-Hagen, J.; Boyer, B. B.; Kozak, L. P.; Flier J. S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366:740-742, 1996.

Mantzoros, C. S.; Qu, D.; Frederich, R. C.; Susulic, V. S.; Lowell, B. B.; Maratos-Flier, E.; Flier, J. S. Activation of beta (3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes*, 45 (7): 909-914, 1996.

Martí O.; Martí, J.; Armario A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol. Behav.* 55:747-753; 1994.

Pelleymounter, M.; Cullen, M.; Baker, M.; Hecht, R.; Winters, D. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269:540-543; 1995.

Porte Jr.; Woods, S.C. Regulation of food intake and body weight by insulin. *Diabetologia*, v. 20 (Suppl.), p. 274-280, 1981.

Reul, B. A.; Ongemba, L. N.; Pottier, A. M.; Henquim, J. C.; Brichard, S. M. insulin and insulin-like growth factor I antagonize the stimulation of ob gene expression by dexamethasone in cultured rat adipose tissue. *Biochem. J.* 324: 605-610, 1997.

Sandoval, D. A.; Davis, S. N. Leptin: metabolic control and regulation. *J. Diabetes. Complic.*, v. 17, p. 108-113, 2003.

Scharrer, E.; Langhans, W. Control of food intake by acid oxidation. *Am. J. Physiol.* 250: R1003-R1006, 1986.

Sinha, M. K.; Operntanova, I.; Ohannesian, J. P.; Kolaczynski, J. W.; heiman, M. L.; Hale, J.; Becker, G. W.; Bowsher, R. R.; Stephens, T. W., Caro, J. F. Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J. Clin. Invest.*, 98: 1277-1282, 1996.

Trayhurn, P.; Thomas, M. E.; Duncan, J. S.; Rayner, D. V. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ ob) mice. *FEBS Lett.* 368 (3): 488-490, 1995.

Tsujii, S.; Bray, G. A. A β -3 adrenergic agonist (BRL 37,344) decreases food intake. *Physiol. Behav.* 63(4):723-728; 1998.

Tsujii, S.; Bray, G. A. Food intake of lean and obese Zucker rats following ventricular injections of adrenergic agonists. *Brain Res.* 587:226-232, 1992.

Vallès, A.; Martí, O.; García A.; Armario A. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am. J. Physiol. Regulatory integrative Comp. Physiol.* 279:R1138-R1144; 2000.

Verago JL, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC: Metabolic markers following β -adrenoceptor agonist infusion in foot shock stressed rats. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* , v. 34, n. 9, p. 1197-1207, 2001.

Walston, J.; Silver, K. ; Bogardus, C.; Knowler, W. C.; Celi, F. S.; Austin, S.; Manning, B.; Strosberg, A. D.; Stern, M. P.; Raben, N.; Sorkin, J. D.; Roth, J.; Shuldiner, A. R. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β ₃-adrenergic-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 333:343-347, 1995.

Weigle, D. S.; Duell, P. B.; Connor, W. E.; Steiner, R. A.; Soules, M. R.; Kujiper, J. L. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:561-565, 1997.

IV. CONCLUSÕES

Nós concluímos que ratos submetidos a estresse por choques nas patas apresentam:

1. alteração no perfil glicêmico e insulinêmico durante o teste de tolerância à glicose que sugerem o desenvolvimento de resistência à insulina. Esta foi demonstrada em adipócitos mas não no tecido hepático ou em músculos esqueléticos. Neste modelo experimental, a tolerância à insulina não está associada a alterações na resposta das ilhotas de Langerhans à glicose;

2. em adipócitos do tecido adiposo epididimal, subsensibilidade à noradrenalina e ao BRL 37344 associada a “down-regulation” dos adrenoreceptores β_1 e β_3 , respectivamente; supersensibilidade à isoprenalina e à adrenalina, associada a “up-regulation” dos adrenoreceptores β_2 . Nas células adiposas ocorre também “down-regulation” dos receptores de glicocorticóide.

3. aumento da concentração plasmática de lactato.

4. diminuição da ingesta alimentar, que não está associada a alteração na concentração plasmática de leptina, mas é acompanhada de aumento da concentração plasmática de insulina. O estresse não altera a secreção de leptina em ratos alimentados.

Em resumo, podemos dizer que ratos submetidos a estresse por choque nas patas apresentam importantes modificações funcionais, moleculares e comportamentais, afetando variáveis metabólicas que podem garantir a adaptação do organismo ou determinar instalação de doenças. Esse modelo de estresse pode ser utilizado para o estudo de fatores desencadeadores de quadros patológicos associados ao estresse, tais como resistência à insulina e anorexia.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S. N.; MARTIN, M. W.; HUGHES, A. R.; HARDEN, T. K.; NEVE, K. A.; BARRETT, D. A.; MOLINOFF, P. B. Interaction of β -adrenergic receptors with the inhibitory guanine nucleotide-binding protein of adenylate cyclase in membranes prepared from cyc^S49 lymphoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, p. 4289-4297, 1988.

AHIMA, R. S.; OSEI, S. Y. Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends Mol. Med.*, v. 7, p. 205-213, 2001.

AHLQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, v. 153, p. 586-600, 1948.

AL-DAMLUJI, S. Adrenergic mechanisms in the control of corticotrophin secretion. *J. Endocrinol.*, v. 119, n. 1, p. 5-14, 1988.

ANISHCHENKO, T. G.; GUDKOVA, E. V. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenalin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v. 113, n. 6, p. 769-771, 1992.

ARNER, P. Adrenergic receptor function in fat cells. *Amer. J. Clin. Nutritional*, n. 55, p. 2285-2336S, 1992.

ARNER,P.; HELLSTROM,L.; WAHRENBERG,H. & BRONNEGARD,M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J. Clin.Invest.*, v. 86, p. 1595-1600, 1990.

_____ ; KRIEGHOLM,E; ENGFELDT,P. & BOLINDER,J. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. J.Clin. Invest., v. 85, p. 893-898, 1990.

ASHBY, P.; ROBINSON, D. S. Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipids. Biochem. J., v. 188, n. 1, p. 185-192, 1980.

ATEF, N.; LAFONTAN, M.; DOUBLE, A.; HELARY, C.; KTORZA, A.; PENICAUD, L. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. Eur. J. Pharmacol., v. 298, n. 3, p. 287-292, 1996.

AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. Science, v. 224, n. 4648, p. 452-459, 1984.

BARRE, H.; GÉLOEN, A.; CHATONNET, J.; DITTMAR, A.; ROUANET, J. L. Potentiate muscular thermogenesis in the cold-acclimated muscovy duckling. Am. J. Physiol., v. 249, p. R533-R538, 1985.

_____ ; GÉLOEN, A.; MIAHLE, P.; ROUANET, J. L. Effects of glucagon on birds thermogenesis. In: Endocrine regulations as adaptative mechanisms to the environment. Assenmacher, I. et Boissin, J. (Edits) CNRS, Paris, p. 395-401, 1986.

BASKIN, D.G.; FIGLEWICZ, L. D.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C.; PORTE, D.JR.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for regulation of food intake and body weight. Brain Res., v. 848, p. 114-123, 1999.

BASSANI, R. A.; DE MORAES, S. Effects of repeated foot shock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 246, n. 1, p. 316-321, 1988.

BENOIT, S. C.; AIR, E. L.; COOLEN, L. M.; STRAUSS, R.; JACKMAN, A.; CLEGG, D. J.; SEELEY, R. J. WOODS, S.C. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.*, v. 22, n. 20, p. 9048-9052, 2002.

BENOVIC, J.L.; BOUVIER, M.; CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R. J. Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *Annu. Rev. Cel. Biol.*, v. 4, p. 405-28, 1988.

BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 20, p. 189-287, 1996.

BLUNDELL, J. E.; GOODSON, S.; HALFORD, J. C. G. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. *Int. J. Obesity*, v. 25 (Suppl. 1), p. S29-S34, 2001.

BOLLEN, M.; STALMANS, W. The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 37, n. 3, p. 227-281, 1992.

BOWEN, W.P. et al. Regional and interspecific differences in the ligand binding properties of adrenergic receptors of individual white adipose tissue depots in the sheep and rat. *Biochem. Pharmacol.*, v. 44, n. 4, p. 681-686, 1992.

BRINDLEY, D. N.; AKESTER, H.; DERRICK, G. P.; IRVINE, C. D.; PATMORE, R. D.; SPENCER, H.; YULE-SMITH, A.; FINNERTY, C.; SAXTON, J.; MACDONALD, I. A.; ROLLAND, Y. Effects of chronic administration of benfluorex to rats on the metabolism of corticosterone, glucose, triacylglycerols, glycerol and fatty acid. *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, n. 4, p. 695-705, 1988.

BROWN, M. R.; FISHER, L. A. Brain peptide regulation of adrenal epinephrine secretion. *Am. J. Physiol.*, v. 247, n. 1 pt 1, p. E41-E46, 1984.

_____ Corticotrophin-releasing factor: effects on the autonomic nervous system and visceral systems. *Fed. Proc.*, v. 44, p. 234-248, 1985.

CANNON, W.; DE LA PAZ, D. Emotional situation of adrenal gland secretion. *Am. J. Physiol.*, v. 28, p. 64-70, 1911.

_____ & LISSAK, K. Evidence for adrenaline in adrenergic neurones. *Am. J. Physiol.*, v. 125, p. 765-777, 1914.

_____ The emergency function of the adrenal medulla in pain and in the major emotions. *Am. J. Physiol.*, v. 33, p. 356-372, 1914.

_____ Organization for physiology homeostase. *Physiol. Rev.*, v. 9, p. 399-431, 1929.

_____ The wisdom of the body. Ed. W. W. Norton, New York, 1939.

CHOI, C.S.; KIM, Y. B.; LEE, F. N.; ZABOLOTNY, J. M.; KAHN, B. B.; YOUN, J. H. Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impairing insulin signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 283, p. E233-E240, 2002.

CLARK, A. S.; MITCH, W. E.; GOODMAN, M. N.; FAGAN, J. M.; GOHEER, M. A.; CURNOW, R. T. Dichloroacetate inhibits glycolysis and augments insulin-stimulated glycogen synthesis in rat muscle. *J. Clin. Invest.*, v. 79, p. 588-594, 1987.

CONNOLLY, C. C.; STEINER, K. E.; STEVENSON, R. W.; NEAL, D. W. WILLIAMS, P. E.; ALBERTI, K. G.; CHERRINGTON, A. D. Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, v. 261, n. 4 pt 1, p. E466-E472, 1991.

CONSOLI, A.; NURJHAN, N. & GERICH, J. Rates of appearance and disappearance of plasma lactate after oral glucose: implications for indirect-pathway hepatic glycogen repletion in man. *Clin. Physiol. Biochem.*, v. 7, p. 70-78, 1989.

CRANDALL, D. L.; FREED, S. K., FRANCENDESE, A. A, NECKEL, M & DI GIROLAMO, M. Lactate release from isolated rat adipocytes. Influence of cell size, glucose concentration, insulin and epinephrine. *Horm. Metab. Res.*, v. 15, p. 326-329, 1983.

CRONIGER, C.; LEAHY, P.; RESHEF, L.; HANSON, R. W. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 48, p. 31629-31632, 1998.

DAAKA, Y.; LUTTRELL, L. M. & LEFKOWITZ, R. J. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G protein by protein kinase A. *Nature*, v. 390, p. 88-91, 1997.

DALMANN, M. F.; STRACK, A. M.; AKANA, S. F.; BRADBURY, M. J.; HANSON, E. S.; SCRIBNER, K. A.; SMITH, M. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front. Neuroendocrinol.*, v. 14, p. 303-347, 1993.

DARIMONT, C.; SAINT-MARC, P.; AILHAUD, G.; NEGREL, R. Modulation of vascular tone and glycerol levels measured by *in situ* microdialysis in rat adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, v. 271, n. 4 pt 1, p. E631-E635, 1996.

DEFRONZO, R.A. The triumvirate: B-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, v. 37, p. 667-687, 1987.

DEPRE, C.; PONCHAUT, S.; DEPREZ, J.; MAISIN, L.; HUE, L. Cyclic AMP suppress the inhibition of glycolysis by alternative oxidizable substrates in the heart. *J. Clin. Invest.*, v. 101, p. 390-397, 1998.

_____ ; VEITCH, K.; HUE, L. Role of fructose 2,6-biphosphate in control of glycolysis. Stimulation of glycogen synthesis by lactate in isolated working rat heart. *Acta Cardiol.*, v. 48, p. 147-164, 1993.

DESHAIES, Y.; GÉLOEN, A.; PAULIN, A.; MARETTE, A.; BUKOWIECKI, L. J. Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. *Horm. Metab. Res.*, v. 25, n. 1, p. 13-16, 1993.

DIGIROLAMO, M.; NEWBY, F.D. & LOVEJOY, J. Lactate production in adipose tissue: a regulated functions with extra-adipose implications. *FASEB J.*, v. 6, p. 2405-2412, 1992.

ELIOT, R. S. Fisiologia do estresse. In: ELIOT, R. S. Estresse e o coração: mecanismos, avaliação e cuidados. Rio de Janeiro: Revinter, 1992. cap. 4, p. 23-30.

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*, v. 96, n. 1, p. 85-92, 1975.

EXTON, J. H.; FRIEDMANN, N.; WONG, E. H.; BRINEAUX, J. P.; CORBIN, J. D.; PARK, C. R. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, v. 247, n. 11, p. 3579-3588, 1972.

FAIN, J. N.; GARCÍA-SÁINZ, J. A. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid Res.*, v. 24, n. 8, p. 945-966, 1983.

FAINTRENIE, G & GÉLOËN, A. Lactate production by white adipocytes in relation to insulin sensitivity. *J. Pharmacol. Am. J. Physiol.*, v. 270, p. C1061-C1066, 1996a.

Alpha-1 adrenergic regulation of lactate production by white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 277, n. 1, p. 235-238, 1996b.

Alpha-1 adrenergic stimulation of glucose uptake in rat white adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 286, p. 607-610, 1998.

FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D. M., WOLF-NUNES, V.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *J. Lip. Res.*, v. 40, n. 9, p. 1719-1727, 1999.

_____; SAMPAIO-BARROS, M.M.; AMARAL, M.E.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A. C.; GRASSI-KASSISSE, D. M., & SPADARI-BRATFISCH, R. C. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot shock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 80, n. 8, p. 783-789, 2002.

_____; SANTOS IN, AMARAL M. E. C., GRASSI-KASSISSE, D. M., SPADARI-BRATFISCH, R. C. Glucocorticoid receptor (GR) and beta-adrenoceptors (β -AR) in epididimal adipose tissue from stressed. *Endoc. Regulations*, v. 37, n. 2, p. 97, 2003.

FEDERSPIL, G.; ZACCARIA, M.; PEDRAAZZOLI, S.; ZAGO, E.; DEPALO, C.; SANDELLARI, C. Effects of sodium BL-Lactate on insulin secretion in anesthetized dogs. *Diabetes*, v. 29, p. 33-36, 1980.

FÈVE, B.; BAUDE, B.; KRIEF, S. Inhibition by dexamethasone of β_3 -adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 22, p. 15909-15915, 1992

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v. 395, p. 763-770, 1998.

FRIELLE, T.; COLLINS, S.; DANIEL, K. W. et al. Cloning of DNA for the human beta1 adrenergic receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 7920-7924, 1987.

GALITZKY, J.; LARROUY, D.; BEERLAN, M.; LAFONTAN, M. New tools for human fat cell alpha2-adrenoceptors. II. Comparative study of partial and full agonist binding parameters using [³H]RX821002. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 252, p. 312-319, 1990.

GALITZKY, J.; LAFONTAN, M.; NORDENSTROM & ARNER, P. Role of vascular alpha2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 1997-2003, 1993.

_____ ; REVERTE, M.; CARPENÉ, C.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Beta 3-adrenoceptors in dog adipose tissue: studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 266, n. 1, p. 358-366, 1993.

_____ ; REVERTE, M.; PORTILLO, M. et al. Coexistence of beta1, beta2 and beta3-adrenoceptors in dog fat cells: their differential activation by catecholamines. *Am. J. Physiol.*, v. 264, p. E403-E412, 1993.

GARDEMANN, A.; JAHNS, U.; JUNGGERMANN, K. Control of glycogenolysis and blood flow by arterial and portal norepinephrine in perfused liver. *Am. J. Physiol.*, v. 260, n. 5 pt 1, p. E762-E771, 1991.

GARVEY, W. T.; HUECKSTEADT, T. P.; LIMA, F. B.; BERNBAUM, M. J. Expression of a glucose transporter gene cloned from brain in cellular models of insulin resistance: dexamethasone decreases transporters mRNA in primary cultured adipocytes. *Mol. Endocrinol.*, v. 3, n. 7, p. 1132-1141, 1989.

GAUTHIER, P.; NADEAU, R.; DE CHAMPLAIN, J. Acute and chronic cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine in dogs. *Circ. Res.*, v. 31, p. 207-217, 1972.

GERRA, G.; ZAIMOVIC, A.; MASCETTI, G. G.; GARDINI, S.; ZAMBELLI, U.; TIMPANO, M.; RAGGI, M. A.; BRAMBILLA, F. Neuroendocrine response to experimentally-induced psychological stress in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology*, v. 26, p. 91-107, 2001.

GILMAN, A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 56, p. 615-649, 1987.

GOLDSTEIN, D. S. Catecholamines and stress. *Endocr. Regul.*, v. 37, p. 69-80, 2003.

GRIFFIN, J. F. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 20, n. 3, p. 263-312, 1989.

HALFORD, J. C.; BLUNDELL, J. E. Pharmacology of appetite suppression. *Progr. Drug. Res.*, v. 54, p. 25-28, 2000.

HEIM C.; EHLER, U.; HELLHAMMER, D. H. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology*, v. 25, p. 1-35, 2000.

HENNESSY, M. B.; HEYBACH, J. P.; VERNIKOS, J.; LEVINE, S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol. Behav.*, v. 22, n. 5, p. 821-825, 1979.

HERD, J. A. Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, v. 71, n. 1, p. 305-330, 1991.

HERNÁNDEZ, A.; OBREGÓN, M. J. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.278, p. E769-E777, 2000.

HIMMS-HAGEN, J. Sympathetic regulation of metabolism. *Pharmacol. Rev.*, v. 19, n. 3, p. 367-461, 1967.

HOLLENGA, C. H. & ZAASGMA, J. Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptor in rat adipocytes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 98, p. 1420-1424, 1989.

HORNER, H. C.; MUNCK, A.; LIENHARD, G. E. Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, v. 262, n. 36, p. 17696-17702, 1987.

HUE, L.; FELIU, J. E.; HERS, H. G. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon. *Biochem. J.*, v. 176, n. 3, p. 791-797, 1978.

HULSMANN, W. C.; DUBELAAR, M. L. Lipoprotein lipases and stress hormones: studies with glucocorticoids and cholera toxin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 875, n. 1, p. 69-75, 1986.

INUI, A. Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides-mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci.*, v. 22, p. 62-67, 1999

JULIEN, C.; KANDZA, P.; BARRESC.; LO, M.; CERUTTI, C.; SASSARD, J. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, v. 259, p. H1337-H1342, 1990.

KALRA, S. P.; DUBE, M. G.; PU, S.; XU, B.; HORVARTH, T.L.; KALRA, P. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.*, v. 20, p. 68-100, 1999.

KANT, G. J.; BUNNELL, B. N.; MOUGEY, E. H.; PENNINGTON, L. L.; MEYERHOFF, J. L. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 18, n. 6, p. 967-971, 1983.

KAUMANN, A. J. Is there a third heart β -adrenoceptor? *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 10, p.316-320, 1989.

_____ Four β -adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *TiPS*, v.18, p. 71-76, 1997.

_____ ; MOLENAAR, P. Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 335, p. 667-681, 1997.

_____ ; ENGELHARDT, S.; HEIN, L. Abolition of (-)-CGP12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptor for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, v. 363, p. 87-93, 2001.

KHAN, A. H.; PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*, v. 45, p. 1475-1483, 2002.

KIM, J. K.; CHOI, C. S.; YOUN, J. H. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high fat feeding in rats. *Diabetes*, v.45, p. 651-658, 1996.

KNEER, N. M.; LARDY, H.A. Regulation of gluconeogenesis by norepinephrine, vasopressin, and angiotensin II: a comparative study in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} . Arch. Biochem. Biophys., v. 225, n. 1, p. 187-195, 1983.

KNOX, A. M.; STURTON, R. G.; COOLING, J.; BRINDLEY, D. N. Control of hepatic triacylglycerol synthesis. Diurnal variations in hepatic phosphatidate phosphohydrolase activity and in the concentrations of circulating insulin and corticosterone in rats. Biochem. J., v. 180, n. 2, p. 441-443, 1979.

KOBILKA, B. K.; DIXON, A. F.; FRIELLE, J. et al. cDNA for the human beta2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 46-50, 1987.

KOCH, W. J.; LEFKOWITZ, R. J.; ROCKMAN, H. A. Functional consequences of alternating myocardial adrenergic receptor signaling. Ann. Rev. Physiol., v. 62, p. 237-260, 2000.

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, v. 16, n. 5-6, p. 293-311, 1974.

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

_____ ; BOUSQUET-MELOU, A.; GALITIZKY, J.; BARBE, P.; CARPÉNÉ, C.; LANGIN, D.; BERLAN, M.; VALET, P.; CASTAN, I.; BOULOUMIÉ, A.; SAULNIER-BLANCHE, J-S. Adrenergic adrenoceptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. *Obes. Res.*, v. 3 (suppl 4), p. 507s-514s, 1995.

_____ Lipid metabolism in adipose tissue: adrenergic control of the adipocyte and mobilization of the lipids. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, v. 62, n. 4 pt 2, S7-S17, 2001.

_____ ; BERLAN, M.; STICH, V.; CRAMPES, F.; RIVIERE, D.; DE GLISEZINSKI, I.; SENGES, C.; GALITIZKY, J. Recent data on the regulation of lipolysis by catecholamines and natriuretic peptides. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, v. 63, n. 2 pt 1, 86-90, 2002.

LAKE, C.R.; ZIEGLER, M. G.; KOPIN, I. J. Use of plasma norepinephrine for evaluation of sympathetic neuronal function in man. *Life Sci.*, v. 18, p. 1315-1325, 1976.

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

_____ ; LUDUENA, F.P.; BUZZO, H. J. et al. Differentiation of receptor activated by sympathomimetic amines. *Nature*, v. 241, p. 597-598, 1967b.

LANGER, S. Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.*, v. 23, p. 1793-1800, 1974.

LANGIN, D.; PORTILLO, M.; SAULNIER-BLANCHE, J.-S.; LAFONTAN, M. Coexistence of three beta-adrenergic receptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 199, p. 191-301, 1991.

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

LESCOAT, G.; JEGO, P.; BERAUD, G.; MANIEY J. Sex influences on the response of the hypothalamo-hypophysis-adrenal axis to emotional and systemic stress in the rat. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, v. 164, n. 10, p. 2106-2113, 1970.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A.; ROUTH, V. H. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am. J. Physiol.*, v. 276, p. 1223-1231, 1999.

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

LIN, E. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 46, p. 765-795, 1977.

LOWE, M. D.; GRACE, A. A.; KAUMANN, A. J. Blockade putative β_4 -adrenoceptors by carvedilol in ferret myocardium. *Naunyn-schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 359, p. 400-403, 1999.

_____; LYANHAM, J. A.; GRACE, A. A.; KAUMANN, A. J. Comparison of the affinity of beta-blockers for two states of the β_{1A} -adrenoceptor in the ferret ventricular myocardium. *Br. J. Pharmacol.*, v. 135, p. 451-461, 2002.

LUGER, A.; DEUSTER, P. A.; GOLD, P. W.; LORIAUX, D. L.; CHROUSOS, G. P. Hormonal responses to the stress of exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 245, p. 273-280, 1988.

MACHO, L., FICHOVÁ, M., ZÓRAD, Š., AND KVETNANSKÝ, R.. Changes of insulin binding in rat tissues after exposure to stress. *Physiol. Res.* 48: 51-58, 1999.

MANGIAPANE, E. H.; BRINDLEY, D. N. Effects of dexamethasone and insulin on the synthesis of triacylglycerols and phosphatidylcholine and the secretion of very-low-density lipoproteins and lysophosphatidylcholine by monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, v. 233, n. 1, p. 151-160, 1986.

MARCONDES, F. K; VANDERLEI, L. C. M.; LANZA, L. L. B.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, p. 663-669, 1996.

MARPLES, D. N. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.*, v. 35, n. 3, p. 576-579, 1972.

MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, v. 30, n. 5 (suppl), p. 576-607, 1968a.

MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom. Med.*, v. 30, n. 5 (suppl), p. 631-653, 1968b.

MAURIÈGE, P.; GARLITZKY, J.; BERLAN, M. & LAFONTAN, M. Heterogeneous distribution of beta and alpha2-adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 17, p. 156-165, 1987.

McEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.*, v. 33, pp. 171-179, 1998.

MERCER, J. G.; SPEAKMAN, J. R. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulation energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 25, p. 101-116, 2001.

MILLS, F. J. The endocrinology of stress. *Aviat. Space Environ. Med.*, v. 56, n. 7, p. 642-650, 1985.

MOINAT, M.; DENG, C.; MUZZIN, P et al., Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett.*, v. 373, p. 131-134, 1995.

MORA-RODRIGUEZ, R. and COYLE, E. F. Effects of plasma epinephrine on fat metabolism during exercise: interactions with exercise intensity. *Endocrinol. Metab.*, v. 278, n. 4, E669-E676, 2000.

MOURA, A. L., Sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em átrio esquerdo isolado de ratos submetidos a estresse. 2002. 69 fs. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NISWENDER, K. D.; SCHWARTZ, M. W. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signalling capabilities. *Front. Neuroendocrinol.*, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2003.

NEWBY, F.D.; WILSON, L.K.; TRACKER, S.V. & DIGIROLAMO, M. Adipocyte lactate production remains elevated during refeeding after fasting. *Am. J. Physiol.*, v. 259, p. E865-E871, 1990.

_____; SYKES, M & DIGIROLAMO, M. Regional differences in adipocyte lactate production from glucose. *Am. J. Physiol.*, v. 255, p. E716-E722, 1988.

NEWGARD, C. B.; BRADY, M. J.; O'DOHERTY, R. M.; SALTIEL, A. R. Perspectives in diabetes. Organizing glucose disposal. Emerging roles of the glycogen targetin subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes*, v. 49, p. 1967-1977, 2000.

NOMURA, S. WATANABE, M.; UKEI, N.; NAKAZAWA, T. Stress and beta-adrenergic receptor binding in the rat's brain. *Brain Res.*, v. 224, n. 1, p. 119-203, 1981.

NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, v. 43, p. 533-549, 2000.

OOMURA, Y.; ONO, T.; OYAMA, H.; WAYNER, M. J. Glucose and osmosensitive neurons of the rat hypothalamus. *Nature*, v. 222, p. 282-284, 1969.

_____ Input-output organisation in the hypothalamus relating to food intake behavior. In: *Physiology of the hypothalamus*. Morgane, P.J.; Panksepp, J. *Handbook of the Hypothalamus*. Ed. Marcel Dekker, New York v. 2, p. 557-620, 1980.

PALKOVITS, M. Neuroanatomical overview of brain neurotransmitters in stress. In: *Stress: neurochemical and humoral mechanisms*, v.1 Ed. Gordon & Breach Scientific Publishers, p. 31-42, 1989.

_____ Peptidergic neurotransmitters in the endocrine hypothalamus. In: Functional anatomy of the neuroendocrine hypothalamus. Ciba Foundation Symposium 168, p. 3-15, 1992.

PARÉ, W. P.; REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol. Behav.*, v. 54, n. 6, p. 1179-1185, 1993.

PATEL, J. N.; COPPACK, S. W.; GOLDSTEIN, D.S.; MILES, J. M.; EISENHOFER, G. Norepinephrine spillover from human adipose tissue before and after a 72-hour fast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 87, p. 3373-3377, 2002.

PAULETTO, P.; SCANNAPIECO, G.; PESSINA, A. C. Sympathetic drive and vascular damage in hypertension and atherosclerosis. *Hypertension*, v. 17 (4 suppl.), p. III75-81, 1991.

PEARCE, F. J.; CONNETT, R. J. Effect of lactate and palmitate on substrate utilization of isolated rat soleus. *Am. J. Physiol.*, v. 238, p. C149-159, 1980.

PILKIS, S. J.; EL-MAGHRABI, M. R.; CLAUS, T. H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 57, p. 755-783, 1988.

_____; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Ver. Physiol.*, v. 54, p. 885-909, 1992.

PITTNER, R. A.; FEARS, R.; BRINDLEY, D. N. Effects of cyclic AMP, glucocorticoids and insulin on the activities of phosphatidate phosphohydrolase,

tyrosine aminotransferase and glycerol kinase in isolated rat hepatocytes in relation to the control of triacylglycerol synthesis and gluconeogenesis. *Biochem. J.*, v. 225, n. 2, p. 455-462, 1985a.

_____; FEARS, R.; BRINDLEY, D. N. Interactions of insulin, glucagon and dexamethasone in controlling the activity of glycerol phosphate acyltransferase and the activity and subcellular distribution of phosphatidate phosphohydrolase in cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.*, v. 230, n. 2, p. 525-534, 1985b.

POLLARD I.; WHITE, B.; BASSET, J.R. & CAIRNCROSS, K.D.. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrus cycle following unpredictable stress in rat. *Behav. Biol.*, v. 14, p. 103-108, 1975.

PORTE JR., D. Sympathetic regulation of insulin secretion. Its relation to diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.*, v. 123, n. 3, p. 252-260, 1969.

_____; ROBERTSON, R. P. Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system. *Fed. Proc.*, v. 32, n. 7, p. 1792-1796, 1973.

_____.; WOODS, S.C. Regulation of food intake and body weight by insulin. *Diabetologia*, v. 20 (Suppl.), p. 274-280, 1981.

PORTER, M.H.; CUTCHINS, A.; FINE, J.B.; BAY, Y.; DIGIROLAMO, M. Effects of TNF-alpha on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat cell preparations. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 139, n. 3, p. 140-146, 2002.

PRATT, W. B. Glucocorticoid receptor structure and the initial events in signal transduction. *Prog. Clin. Biol. Res.*, v. 322, p. 119-132, 1990.

RADZIUK, J.; PYE, S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, v. 17, p. 250-272, 2001.

RETANA-MARQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VAZQUEZ-PALACIOS, G.; DOMINGUEZ-SALAZAR, E.; MARTINEZ-GARCIA, R.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psiconeuroendocrinology*, v. 28, n. 2, p. 207-227, 2003.

RIEGLE, G. D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1973.

RISTOW, M.; VORGERD, M.; MOHLIG M.; SCHATZ, H.; PFEIFFER, A. Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans impairs insulin secretion and causes insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v. 100, p. 2833-2841, 1997.

_____; VORGERD, M.; MOHLIG M.; SCHATZ, H.; PFEIFFER, A. Insulin resistance and impaired insulin due to phosphofructo-1-kinase-deficiency in humans. *J. Mol. Med.*, v. 77, p. 96-103, 1998.

RODGERS, R. J.; IHII, Y.; HALFORD, J. C. G.; BLUNDELL, J. E. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides*, v. 36, n. 5, p. 303-325, 2002.

RODRIGUES, M. L.; MARCONDES, F. K.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level, and estrous cycle in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 73, n. 5, p. 602-607, 1995.

SAAD, M.J.A., FOLLI, F., KAHN, J.Á., AND KAHN, C.R. Modulation of insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone treated rats. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 2065-2072, 1993.

_____; MONTE-ALEGRE, S.; SAAD, S.T. Cortisol levels in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Horm. Res.*, v.35, n. 1, p. 1-3, 1991.

SAMPAIO-BARROS, M. M. ; FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rat. *Stress*, v. 6, n.2, 2003.

SANDOVAL, D. A.; DAVIS, S. N. Leptin: metabolic control and regulation. *J. Diabetes. Complic.*, v. 17, p. 108-113, 2003.

SANTOS, I. N.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Chronotropic response to (+/-)-CGP12177 in right atria of stressed rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 79, n. 5, p. 393-399, 2001.

_____; ANTONINI, S.; CASTRO, M.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Glucocorticoid receptor (GR) and beta2-adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Stress*, v. 5 (suppl.), p. 121, 2002.

_____; MARCONDES, F. K.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. The beta1-adrenoceptor site activated by CGP 12177 varies in behavior according to the estrous cycle phase and stress. *Can. Physiol. Pharmacol.*, v. 81, n. 5, p. 459-468, 2003.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*, v. 21, p. 55-89, 2000.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 205, p. 260-272, 1982.

SCARPACE, P.J. Decreased receptor activation with age can it be explained by desensitization? *JAGS*, v. 36, p. 1067-1071, 1988.

SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C.; WEIGLE, D. S.; CAMPFIELD, L. A.; BURN, P.; BASKIN, D. G. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, v. 46, n. 12, p. 2119-2123, 1997.

_____ ; WOODS, S. C.; PORTE JR, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, p. 661-671, 2000.

SCHEINMAN, R. I.; GUALBERTO, A.; JEWELL, C. W.; CIDLOWSKI, J. A.; BALDWIN, A. S. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.*, v. 15, p. 943-953, 1995.

SELYE, H. A The stress of life. New York: MacGraw-Hill, p. 324, 1956.

_____ Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, v. 138, n. 1, p. 32, 1936.

_____ The story of the adaptation syndrome. *Acta*, Montreal, 1952.

_____ The stress of life. MacGraw-Hill Books Inc.; New York, 324 pages, 1956.

SLAVIN, B. G.; ONG, J. M.; KERN, P. A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J. Lipid Res.*, v. 35, n. 9, p. 1535-1541, 1994.

SMITH, D.F.; TOFT, D. O. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.*, v. 7, p. 4-11, 1993.

SOUZA, A. R. T. Estresse e sensibilidade às catecolaminas em átrio de cobaia. 2001. 57 fs. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SPADARI, R. C. & DE MORAES, S.. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effects of adrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmac.*, v. 19, n. 4, p. 553-7, 1988.

_____ ; 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.*, v. 19, n. 1, p. 129-135, 1988.

SPADARI-BRATFISCH, R. C.; SANTOS, I. N.; VANDERLEI, L. C. M.; MARCONDES, F. K. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 77, p. 432-440, 1999.

STALMANS, W.; LALOUX, M. Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monogr. Endocrinol.*, v. 12, p. 517-533, 1979.

STELLAR, E. The physiology of motivation. *Psychol. Rev.*, v. 61, p. 5-22, 1954.

STERLING, P.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In handbook of life stress, cognition and health, Ed. Wiley, New York, p. 629-649, 1988.

TAOUI, M.; BERLAN, M.; MONTASTRUC, P. & LAFONTAN, M. Characterization of dog fat cell adrenoceptors: variations in alpha-2 and beta adrenergic receptors distribution according to the extent of the fat deposits and the anatomical location. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 242, p. 1041-1049, 1987.

_____ ; VALET, P.; ESTAN, L. et al. Obesity modifies the adrenergic status of dog adipose tissue. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 250, p. 1061-1066, 1989.

TOUBRO, S.; SØRENSEN, T. I. A.; RØNN, B.; CHRISTENSEN, N. J.; ASTRUP, A. Twenty-four hour energy expenditure: the role of body composition, thyroid status, sympathetic activity and family membership. J. Clin. Endocrinol. Metab., v. 81, p. 2670-2674, 1996.

TRACKER, S.V.; NICKEL, M & DIGIROLAMO, M. Effects of food restriction on lactate production from glucose by adipocytes. Am. J. Physiol., v. 253, p. E336-E342, 1987.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and auto-immune disorders. Endocrinol. Metab. Clin. North Am., v. 23, p. 451-466, 1994.

_____.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J. Psychosomatic Res., v. 53, p. 865-871, 2002.

VAN DE KAR, L. D.; RICHARDSON-MORTON, K. D.; RITTENHOUSE, P. A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, v. 14, p. 133-173, 1991.

VANDERLEI, L. C.; MARCONDES, F. K.; LANZA, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot shock stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, n. 6, p. 670-678, 1996.

VERAGO, J. L.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in foot shock-stressed rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, n. 9, p. 1197-1207, 2001.

VETTOR, R.; LOMBARDI, A. M.; FABRI, R.; PAGANO, C.; CUSIN, I.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; FEDERSPIL, G.; JEANRENAUD, B. Lactate infusion in anesthetized rats produces insulin resistance in heart and skeletal muscles. *Metabolism*, v. 46, p. 684-690, 1997.

VOGEL, W. H.; JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci. Lett.*, v. 87, n. 1-2, p. 183-188, 1998.

VON EULER, U. S. A specific sympathomimetic ergone in arenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol. Scand.*, v. 12, p. 73-96, 1946.

VON HOLT; FIESTER, J. The effect of cortisol on synthesis and degradation of liver glycogen. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 90, p. 232-238, 1964.

WATT, M. J.; HOWLETT, K. F.; FEBBRAIO, M. A.; SPRIET, L. L.; HARGREAVES, M. Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J. Physiol.*, v. 534, n. 1, p. 269-278, 2001.

XIAO, R.; JI, X. & LAKATTA, E. G. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, v. 47, p. 322-329, 1995.

YAMAUCHI, T.; IWAI, M.; KOBAYASHI, N.; SHIMAZU, T. Noradrenaline and ATP decrease the secretion of triglyceride and apoprotein B from perfused rat liver. *Pflugers Arch.*, v. 435, n. 3, p. 368-374, 1998.

YETTEFTI, K.; ORSINI, J. C.; PERRIN, J. Characteristics of glycemia-sensitive neurons in the nucleus tractus solitary: possible involvement in nutritional regulation. *Physiol. Behav.*, v. 61, p. 93-100, 1997.

YKI-JARVINEN, H.; BOGARDUS, C.; FOLEY, J. E. Regulation of plasma lactate concentration in resting human subjects. *Metabolism*, v. 39, n. 8, p. 859-864, 1990.

YOREK, M. A.; RUFO JR., G. A.; RAY, P. D. Gluconeogenesis in rabbit liver. III. The influences of glucagon, epinephrine, alpha- and beta-adrenergic agents on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 632, n. 4, p. 517-526, 1980.

YOSHIDA, T. The antidiabetic beta-3-adrenoceptor agonist BRL26830^A works by release of endogenous insulin. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 55 (suppl 1), p. 237S-241S, 1992.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.;MAFFEI, M.; MARONE, M.; LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, v. 372, p. 425-432, 1994.