

Fernanda Klein Marcondes

***Influência do Ciclo Estral sobre as
Respostas Hormonais de Ratas
Submetidas a Estresse***

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

27/12/98 Bic

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

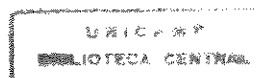
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Regina Célia Spadari-Bratfisch

99465

M333i

36599/BC

Campinas - SP
1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Er
TOMBO BC/	36599
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/02/99
N.º CPD	

CM-00120837-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M331i **Marcondes, Fernanda Klein**
Influência do ciclo estral sobre as respostas hormonais
de ratas submetidas a estresse / Fernanda Klein Marcondes.
-- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
62f.:ilus.

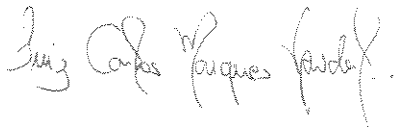
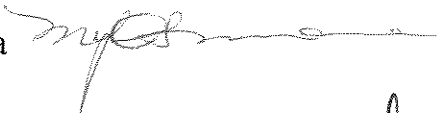
Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1.Stress. 2.Rato. 3 Ciclo sexual. 4.Corticosterona. I. Spadari-
Bratfisch, Regina Célia. II.Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Local e data: Campinas, 17 de dezembro de 1998.

Banca examinadora:

Membros Titulares:

1. Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch 
2. Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei 
3. Profa. Dra. Maria José Costa Sampaio Moura 
4. Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga 
5. Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari 

Membros Suplentes:

1. Profa. Dra Dora Maria Grassi-Kassisse
2. Profa. Dra. Liana Lins Melo

Dedico minha tese a meus pais, Aylde e Assis,
e a meu namorado, amigo e companheiro César.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por tornar possível mais esta conquista
- A meus pais, pelos exemplos, amor, educação e apoio.
- À Zezé, pelo carinho e amizade de todas as horas.
- Ao César, pelo amor e companheirismo
- A meus irmãos, Flavia e Fabricio, pelo carinho e confiança.
- À Kátia, André e Luiz, pela amizade.
- À Prof^a Dr^a Regina Célia Spadari-Bratfisch, pela orientação.
- À Vandí, pelo auxílio no trabalho experimental.
- Aos “colegas de laboratório”, Iraídes, Alexandre, Rita, Josiane, Elisângela e Gustavo, pelos momentos agradáveis e divertidos.
- Ao “Prof. Boschero”, pela utilização de seu laboratório.
- Aos “colegas da FOP”, pelo incentivo e confiança.
- Às secretárias Sônia e Elídia pela boa vontade com que sempre me atenderam.
- À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Determinação das fases do ciclo estral	12
3.3. Estresse por choques nas patas	14
3.4. Estresse por natação.....	14
3.5. Coleta de sangue	15
3.6. Dosagens hormonais	15
3.7. Avaliação do nível de ansiedade de ratas	16
3.8. Grupos experimentais	18
3.8.1. Resposta hormonal de ratas submetidas a estresse	18
3.8.2. Evolução temporal dos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas submetidas a estresse	18
3.8.3. Nível de ansiedade de ratas	19
3.9. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Resposta hormonal de ratas submetidas a estresse	21
4.2. Evolução temporal dos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas submetidas a estresse	24
4.3. Nível de ansiedade de ratas	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ABSTRACT	61

RESUMO

Previamente, havíamos observado que átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de natação, ou choques nas patas, desenvolvem alterações de sensibilidade às catecolaminas. Porém, estas alterações só ocorrem quando o estresse tem início no estro, a segunda sessão é aplicada durante o metaestro, e a última sessão, seguida de sacrifício, ocorre na fase de diestro (Grupo Diestro). Não há alterações quando as sessões são aplicadas durante o diestro, proestro e estro (Grupo Estro).

Nosso objetivo neste trabalho foi estudar as alterações nos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol em ratas submetidas aos mesmos protocolos de estresse repetido citados acima, para avaliar a influência do ciclo estral sobre as respostas hormonais induzidas por aqueles estímulos estressantes. Também foi nosso objetivo verificar se há alguma correlação entre estas respostas hormonais e o desenvolvimento de alterações de sensibilidade adrenérgica em marcapasso isolado de ratas estressadas e sacrificadas durante o diestro, e a ausência das mesmas quando o sacrifício ocorre no estro.

Aumentos semelhantes nos níveis séricos de corticosterona e progesterona, sem alteração nos níveis de estradiol, foram observados nos grupos Diestro e Estro, após três sessões de choques nas patas. Em resposta à natação, houve maior aumento nos níveis séricos de corticosterona no grupo Diestro do que no grupo Estro. Não houve diferença entre as fases do ciclo estral no aumento dos níveis séricos de progesterona; os níveis séricos de estradiol aumentaram no grupo Estro, e não se alteraram no grupo Diestro.

A avaliação da evolução temporal das respostas hormonais de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas mostrou que não há diferenças significativa nas alterações dos níveis de corticosterona e progesterona, entre os grupos Estro e Diestro. Porém, os níveis de estradiol diminuíram no grupo Diestro, após a primeira sessão de choques, voltando aos níveis normais no terceiro dia. No grupo Estro, a aplicação de choques nas patas não induziu alteração dos níveis deste hormônio, sendo observada somente uma elevação nos níveis séricos de estradiol na manhã do segundo dia, quando o animal estava na fase de proestro, que parece ter sido induzida pelo ciclo estral. A análise do nível de ansiedade em ratas controles demonstrou que ratas em proestro apresentam-se

menos ansiosas do que ratas em diestro. Nossos dados parecem sugerir que o aumento nos níveis de corticosterona e progesterona, acompanhado de uma queda nos níveis de estradiol, em ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, durante o estro, metaestro e diestro, poderia determinar o aparecimento das alterações de sensibilidade adrenérgica previamente relatadas nesse grupo experimental. Por outro lado, a ausência de variação dos níveis de estradiol em resposta às sessões de choques, e o menor nível de ansiedade antes da aplicação da segunda sessão, poderiam ser os fatores que evitariam o surgimento de alterações de sensibilidade adrenérgica no marcapasso isolado de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas aplicadas durante o diestro, proestro e estro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Método de coleta de lavado vaginal para determinação da fase do ciclo estral de ratas	13
Figura 2. Células características do esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral de ratas	13
Figura 3. Modelo esquemático do labirinto em cruz elevado.	16
Figura 4. Níveis séricos de CORTICOSTERONA (4A), PROGESTERONA (4B) e ESTRADIOL (4C) de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas ou natação durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro) ou diestro, proestro e estro (grupo Estro).....	22
Figura 5. Níveis séricos de CORTICOSTERONA de ratas controles (5A) nas diferentes fases do ciclo estral, nos períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), e de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (5B - grupo Diestro) ou diestro, proestro e estro (5C - grupo Estro).....	27
Figura 6. Níveis séricos de PROGESTERONA de ratas controles (6A) nas diferentes fases do ciclo estral, nos períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), e de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (6B -Diestro) ou diestro, proestro e estro (6C - Estro).....	29
Figura 7. Níveis séricos de ESTRADIOL de ratas controles (7A) nas diferentes fases do ciclo estral, nos períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), e de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (7B - Diestro) ou diestro, proestro e estro (7C - Estro).....	31
Figura 8. Porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos (8A), porcentagem do número de entradas realizadas nos braços abertos (8B) e número de entradas realizadas nos braços fechados (8C) por ratas submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado nas quatro fases do ciclo estral.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases do ciclo estral de ratas submetidas a estresse	18
Tabela 2. Grupos e fases do ciclo estral de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas.....	20
Tabela 3. Níveis séricos de CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dl}$) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e sacrificadas no diestro ou no estro	23
Tabela 4. Níveis séricos de PROGESTERONA (ng/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e sacrificadas no diestro ou no estro	23
Tabela 5. Níveis séricos de ESTRADIOL (pg/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e sacrificadas no diestro ou no estro	23
Tabela 6. Níveis séricos de CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dl}$) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro).....	28
Tabela 7. Níveis séricos de CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dl}$) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o diestro, proestro e estro (grupo Estro)	28
Tabela 8. Níveis séricos de PROGESTERONA (ng/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro)	30
Tabela 9. Níveis séricos de PROGESTERONA (ng/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o diestro, proestro e estro (grupo Estro)	30
Tabela 10. Níveis séricos de ESTRADIOL (pg/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro)	32
Tabela 11. Níveis séricos de ESTRADIOL (pg/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o diestro, proestro e estro (grupo Estro)	32

1. INTRODUÇÃO

A função primária do ovário é produzir células germinativas, óvulos, que, liberadas em momento e número apropriados, pode garantir o sucesso reprodutivo do indivíduo e, portanto, a sobrevivência da espécie (ARMSTRONG, 1986). Esta função ovariana é possível devido à atividade sintética e secretória das células da granulosa que fazem parte dos folículos ovarianos (ARMSTRONG, 1986; BERNE & LEVY, 1988). Estas células secretam, de forma cíclica, estrógenos e progesterona em resposta às gonadotrofinas provenientes da hipófise que, por sua vez, está sob influência dos fatores liberadores hipotalâmicos (GnRH) e de centros cerebrais superiores (ARMSTRONG, 1986).

A secreção cíclica das gonadotrofinas hipofisárias e dos hormônios esteróides ovarianos caracteriza os ciclos reprodutivos dos mamíferos que têm por finalidade a ovulação, processo no qual o óvulo é liberado pelo ovário e, se fecundado, dará origem a um ovo, que se desenvolverá em embrião. Em alguns animais, a ovulação é sazonal, ocorrendo uma vez por ano (animais monoestros). Porém, animais poliestros como a rata, apresentam vários ciclos reprodutivos ovulatórios anualmente (HOUSSAY, 1980; HOAR, 1975; FREEMAN, 1988).

O ciclo reprodutivo da rata é denominado de ciclo estral e apresenta duração média de 4 a 5 dias. É constituído de quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, com duração média de 12-18h, 25-30h, 24-30h e 28-50h, respectivamente (YOUNG et al., 1941; MANDL, 1951; HOUSSAY, 1980). Estas fases podem ser identificadas pelos tipos celulares que constituem o epitélio vaginal (LONG & EVANS, 1922; HOAR, 1975; YOUNG et al., 1941).

A ovulação ocorre durante o estro, quando a fêmea está receptiva ao macho. Se a fecundação não ocorrer, um corpo lúteo, pequeno e transitório, forma-se durante o metaestro e regride no diestro (HOAR, 1975). O útero, que se apresenta rosado e preenchido por fluidos durante o estro, torna-se fino e anêmico no diestro. Durante o proestro, novos folículos se formam e o útero novamente aumenta de volume em preparação para uma possível implantação durante o estro seguinte (HOAR, 1975). As

alterações uterinas e do epitélio vaginal observadas ao longo do ciclo estral devem-se às ações dos esteróides sexuais nestes tecidos.

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

O ciclo estral e os esteróides sexuais também influenciam diversas funções orgânicas não diretamente relacionadas à reprodução. A temperatura retal de ratas, por exemplo, é maior durante o proestro do que durante o metaestro e diestro, e a progesterona parece estar relacionada a este efeito, ao elevar o ponto fixo hipotalâmico, e ativar mecanismos termogênicos periféricos, como tremor muscular (MARRONE et al., 1976).

A síntese e metabolização de neurotransmissores ou hormônios também variam ao longo do ciclo estral (KUENG et al., 1976). A concentração de serotonina no hipotálamo e sistema límbico diminui durante o proestro (JENNINGS, 1971), fase em que a densidade de receptores cerebrais para serotonina também é 50% menor quando comparada àquela observada durante o diestro (BIEGON et al., 1980). A metabolização deste neurotransmissor, *in vitro*, aumenta durante o proestro no hipotálamo e no núcleo supraquiasmático (McEWEN, 1991). Em resumo, há uma diminuição da atividade serotoninérgica no encéfalo durante o proestro.

Também foi observada maior síntese cerebral de dopamina e noradrenalina durante o proestro quando comparado ao diestro (ZSCHAECK & WURTMAN, 1973).

Além disso, não só a produção, mas a inativação das catecolaminas varia ao longo do ciclo reprodutivo. A atividade da enzima monoamino oxidase (MAO), que metaboliza a noradrenalina e a adrenalina em diferentes órgãos, sofre influência do ciclo estral. Nos ovários e adrenais, a atividade da MAO é mínima na noite entre o estro e o metaestro, e é alta no diestro (HOLZBAUER & YODIM, 1973). No útero, a atividade

desta enzima atinge o pico no metaestro (HOLZBAUER & YODIM, 1973). No hipotálamo, amígdala e córtex frontal, a atividade enzimática é mínima durante o diestro, e aumenta progressivamente, chegando ao pico durante o estro (ZOLOVICK et al., 1966).

Influências do ciclo estral e dos hormônios sexuais foram também observadas sobre a resposta a neurotransmissores. Em fatias de hipotálamo de ratas, o acúmulo de AMPc induzido por noradrenalina, *in vitro*, é significativamente estimulado em tecido obtido de ratas em diestro ou tratadas com estrógeno (ETGEN & PETITTI, 1986). Porém, em tecido isolado de ratas no final da fase de proestro, a resposta é mínima ou inexistente (ETGEN & PETITTI, 1986). Na hipófise, os níveis intracelulares de AMPc apresentam-se baixos na manhã do metaestro, atingindo os maiores níveis na noite do proestro sem alteração nos níveis de GMPc (KIMURA et al., 1980). No hipotálamo medial observou-se aumento dos níveis de AMPc e de GMPc na tarde do diestro para o proestro (KIMURA et al., 1980). Os autores sugeriram que a concentração hipofisária destes nucleotídeos cíclicos aumenta paralelamente ao aumento na secreção de gonadotrofinas que ocorre no proestro. O pico de concentração hipotalâmica destes compostos seria concomitante ao pico dos níveis estrogênicos que ocorrem entre o diestro e o proestro (KIMURA et al., 1980).

Em tecidos periféricos, observou-se aumento na resposta cronotrópica à adrenalina durante o proestro comparado ao estro e ao metaestro, em átrios direitos isolados de ratas normais (RODRIGUES et al., 1995). Em adipócitos, o ciclo estral parece influenciar a atividade lipolítica das catecolaminas (FARIAS, comunicação pessoal).

O ciclo estral também modula comportamentos não diretamente relacionados à reprodução. A atividade voluntária de ratas varia ritmicamente com o ciclo reprodutivo, sendo máxima durante o estro, e esta ritmicidade somente é evidenciada após a puberdade e durante a vida reprodutiva (SLONAKER, 1924). E o comportamento exploratório na gaiola moradia, incluindo locomoção, cheirar, levantar as patas dianteiras, é máximo durante o estro e mínimo no diestro (JENNINGS, 1971).

O comportamento alimentar variou com o ciclo estral, sendo a ingestão de alimento menor no estro do que no diestro (JENNINGS, 1971), sem alteração na ingestão hídrica (MAJEWSKA et al., 1986).

Foram ainda observadas diferentes respostas a testes comportamentais entre as fases do ciclo estral. A taxa de defecação de ratas submetidas ao teste de campo aberto foi menor no estro (CIOCCA et al., 1995). As respostas de esQUIVA condicionada foram facilitadas durante o diestro, diminuídas no proestro e praticamente abolidas durante o estro e o metaestro (DIAZ-VELIZ et al., 1989). O nível de ansiedade, medido com o uso do teste do labirinto em cruz elevado, aumentou durante o metaestro, em ratas sob baixo nível de luminosidade (MORA et al. 1996).

As fases do ciclo estral podem também influenciar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta à apresentação de estímulos estressores (POLLARD et al., 1975; BARON & BRUSH, 1979; VIAU & MEANEY, 1991). A exposição a choques nas patas (POLLARD et al., 1975) ou à imobilização (VIAU & MEANEY, 1991) durante o proestro, resultou em aumentos maiores nos níveis plasmáticos de corticosterona do que durante o estro ou o diestro. Já BARON & BRUSH (1979) observaram aumento significativo na corticosterona plasmática, após estresse por imobilização, apenas durante o estro.

Diferentes estruturas límbicas, tais como o hipocampo, a amígdala e o hipotálamo, estão envolvidas na organização das respostas a estímulos aversivos ou desconhecidos (VAN DER KAR et al., 1991). O sistema límbico em associação com áreas corticais do cérebro emite sinais ativadores ou inibidores alterando a secreção hipofisária dos hormônios adrenocorticotrófico (HOKFELT et al., 1983), do crescimento (KRULICH et al., 1974; SEGGIE & BROWN, 1975; HOKFELT et al., 1983), luteinizante (KRULICH et al., 1974; EUKER et al., 1975), folículo-estimulante (KRULICH et al., 1974) e de prolactina (EUKER et al., 1975; SEGGIE & BROWN, 1975). Também ocorrem alterações nos níveis de β -endorfina (KANT et al., 1983).

O aumento dos níveis plasmáticos de adrenocorticotrofina induz aumento da secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal (AXELROD & REISINE, 1984). Simultaneamente, ocorre ativação do sistema nervoso simpático e da medula adrenal, o que resulta em aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (CANNON et al., 1927; AXELROD & REISINE, 1984; NATELSON et al., 1988).

Em consequência das modificações de natureza neural e hormonal ligadas à reação de estresse, podem ocorrer alterações da sensibilidade adrenérgica em diferentes tecidos.

Em átrios direitos isolados de ratos submetidos a diferentes estímulos estressores observou-se da resposta cronotrópica às catecolaminas. Os protocolos de estresse utilizados foram a exposição ao frio (HARRI et al., 1974; CALLIA, 1981; CALLIA & DE MORAES, 1984), a aplicação de choques nas patas (BASSANI & DE MORAES, 1986; 1987), a imobilização (CAPAZ & DE MORAES, 1988) ou a natação (SPADARI, 1985; SPADARI & DE MORAES, 1988; SPADARI et al., 1988).

Em fêmeas, átrios direitos isolados de ratas em estro submetidas a uma sessão de 50 min de natação, em água a 30°C, apresentaram subsensibilidade à isoprenalina (MARCONDES, 1995). Quando o estresse foi aplicado durante o diestro, houve subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina (MARCONDES, 1995).

Em resposta ao estresse por três sessões de natação, aplicadas em dias consecutivos, durante o estro, metaestro e sacrifício da rata durante o diestro foi observada subsensibilidade do átrio direito isolado à noradrenalina e à adrenalina (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996, VANDERLEI et al., 1996). Porém, quando este protocolo de estresse repetido foi aplicado durante o diestro, proestro e sacrifício durante a fase de estro, não foram detectadas alterações de sensibilidade às catecolaminas no marcapasso cardíaco de ratas (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996, VANDERLEI, 1996).

Também em resposta a estresse por três sessões de choques nas patas, aplicadas em dias consecutivos, durante o estro, metaestro e diestro houve subsensibilidade do átrio direito isolado às catecolaminas, sem alteração quando este protocolo foi aplicado durante o diestro, proestro e estro (MARCONDES et al., 1996, VANDERLEI, 1996; VANDERLEI et al, 1996).

Portanto, em ratas o desenvolvimento de alterações da sensibilidade atrial às catecolaminas em resposta a estímulos estressores depende da fase do ciclo estral.

Em átrios direitos isolados de ratos, as alterações de sensibilidade às catecolaminas, observadas após uma ou três sessões de natação, estão relacionadas respectivamente, à inibição dos sistemas de metabolização das catecolaminas (SPADARI

et al., 1988) e à alteração na constante de afinidade de antagonistas pelos receptores adrenérgicos (SPADARI & DE MORAES, 1988). Os autores propuseram que ambos os mecanismos seriam dependentes do aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, induzidos pela exposição ao estímulo estressor, pois a adrenalectomia bilateral impediu o aparecimento de tais alterações (SPADARI et al., 1998; SPADARI & DE MORAES, 1988).

Quanto às alterações de sensibilidade observadas em resposta ao estresse por três sessões de choques nas patas, além dos mecanismos acima mencionados, ocorreu também alteração da população de β -adrenoceptores que medeiam a resposta cronotrópica às catecolaminas. Enquanto no tecido de ratos controles esta população é homogênea e constituída por adrenoceptores do subtipo β_1 (MINNEMAN & MOLINOFF, 1980; BRYAN et al., 1981), após o estresse repetido por choques nas patas, adrenoceptores do subtipo β_2 também parecem participar da resposta à noradrenalina e à adrenalina (BASSANI & DE MORAES, 1986; 1987). Novamente, o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona induzido pelo estresse foi considerado essencial para que tais alterações ocorressem pois este efeito era bloqueado por administração de um antagonista dos receptores citosólicos de corticosterona - RU 38486 (NOURANI et al., 1992).

Em ratas, o estresse repetido, por choques nas patas ou natação, induziu alterações de sensibilidade adrenérgica no marcapasso cardíaco somente em animais sacrificados durante o diestro, mas não durante o estro (MARCONDES, 1995; VANDERLEI, 1996; SANTOS, 1998). Entretanto, não foram observadas diferenças nos níveis de corticosterona, imediatamente após a terceira sessão de natação, entre ratas sacrificadas no diestro e aquelas sacrificadas durante o estro (MARCONDES, 1995; SANTOS, 1998). Portanto, a corticosterona parece não ser o único fator a determinar as alterações da resposta cronotrópica às catecolaminas em tecido cardíaco de ratas submetidas a estresse.

Em vários tecidos, já foi demonstrado que, além dos glicocorticóides, também o ciclo estral e os esteróides sexuais podem modular a atividade adrenérgica (DAVIES & LEFKOWITZ, 1984).

O número de receptores β -adrenérgicos em útero de ratas é maior durante o estro e o proestro (KRALL et al., 1978). O tratamento com estradiol induziu aumento no

número de receptores α -adrenérgicos e supersensibilidade à noradrenalina em útero (ROBERTS et al., 1977; 1981), em bexiga urinária de coelhas (LEVIN et al., 1980), e em neurônios hipotalâmicos secretores do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) de cobaias fêmeas (CONDON et al., 1989). Em plaquetas de coelhas, o efeito foi inverso (ROBERTS et al., 1979). Da mesma forma, a administração aguda intra-venosa de estrógenos a ratos machos inibiu as respostas vasculares à noradrenalina *in vivo* e *in vitro* (KONDO et al., 1980).

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

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

Alterações dos níveis de progesterona e/ou de estradiol poderiam estar relacionados às alterações de sensibilidade adrenérgica do marcapasso cardíaco de ratas submetidas a estresse e sacrificadas na fase de diestro. Estes hormônios, interagindo com seus respectivos receptores intracelulares podem ativar ou inibir genes responsáveis pela síntese de proteínas, entre as quais, receptores de membrana e, entre estes, os adrenoceptores (BEATO, 1989; MALAYER & GORSKI, 1993).

Poucos autores avaliam os níveis plasmáticos de estradiol em situações de estresse. SANTOS (1998) não observou alteração deste hormônio em ratas sacrificadas em estro ou diestro imediatamente após a terceira sessão de choques nas patas, enquanto MacNIVEN et al. (1992) relataram que estresse crônico aumentou o nível de estrógenos em ratos.

Porém, vários tipos de estresse podem induzir alterações na secreção ovariana e adrenal de progesterona quando aplicados em ratas, em diferentes fases do ciclo estral ou durante a gravidez (OGLE & KITAY, 1977; BRUCE et al., 1984). Em resposta à

manipulação (BRUCE et al., 1984), à administração de anestésicos (BOEHM et al., 1982; BRUCE et al., 1984; DEIS et al., 1989) ou a estresse cirúrgico (NEQUIN & SCHWARTZ, 1971; PLAS-ROSER & ARON, 1977; 1981) observou-se elevação nos níveis plasmáticos de progesterona. Também em ratos machos castrados, observou-se aumento na secreção adrenal de progesterona em resposta a estresse (SCHAEFFER & ARON, 1987).

Assim sendo, seria importante analisar se os níveis de progesterona e/ou estradiol estão alterados em ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e se alterações nos níveis séricos destes hormônios apresentariam alguma correlação com as alterações de sensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse repetido e sacrificadas em diestro, sem alteração no estro (MARCONDES et al., 1996 ; VANDERLEI et al., 1998; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998).

Fatores individuais tais como características genéticas (MARPLE et al., 1972), sexo (LESCOAT et al., 1970; ANISHCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993) e idade (RIEGLE, 1973; BÁNKY et al., 1994) também influenciam a reação de estresse e portanto as alterações hormonais que podem ocorrer em resposta a estímulos estressores. Entretanto, o fator mais importante parece ser a percepção que o indivíduo tem do estímulo que lhe é apresentado. Esta percepção depende das experiências previamente vivenciadas pelo mesmo ou filogeneticamente adquiridas pela espécie, e da novidade ou previsibilidade do estímulo (VOGEL & JENSH, 1988; GRIFFIN, 1989).

A ansiedade é um sintoma emocional intimamente relacionado com o sentimento de medo, e têm geralmente função adaptativa, elevando o estado excitatório do indivíduo, durante a apresentação de um estímulo estressor, ou induzindo inibição comportamental (RANG et al., 1995). Embora o termo ansiedade geralmente seja aplicado para indicar a emoção que uma pessoa sente quando exposta a um agente estressor (VAN DE KAR et al., 1991), um nível basal de ansiedade pode também ser verificada em situações não estressantes. Este nível basal, alto ou baixo, pode induzir maior ou menor ativação das respostas neuroendócrinas e comportamentais a estímulos estressores (RANG e al, 1995).

As alterações de sensibilidade às catecolaminas são observadas em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de estresse, e sacrificadas durante o diestro,

mas não ocorrem quando o animal é sacrificado no estro. Se esta diferença estiver relacionada a diferenças nas variações dos níveis de progesterona e/ou estradiol e corticosterona, dependentes das fases do ciclo estral, qualquer fator que possa alterar as respostas neuroendócrinas ao estresse podem ser importantes para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelas alterações de sensibilidade adrenérgica induzidas por estresse. Portanto, se o nível de ansiedade de ratas variar entre as fases do ciclo estral, as respostas hormonais também poderiam variar, dependendo da fase em que as sessões de estresse fossem aplicadas. Logo, a medida do nível de ansiedade em ratas, antes da apresentação do estímulo estressor, poderia ajudar a esclarecer eventuais diferenças nas respostas hormonais de ratas em diferentes fases do ciclo estral.

A influência dos hormônios esteróides sobre os sistemas neuronais que medeiam as emoções e alguns comportamentos vem sendo investigada. Metabólitos da progesterona e da corticosterona, atuando sobre neurônios GABA-érgicos, apresentam efeitos ansiolíticos em ratos (BITRAN et al., 1991; WIELAND et al., 1991).

Na mulher, a ansiedade que às vezes ocorre durante a síndrome pré-menstrual tem sido associada aos baixos níveis de progesterona em relação aos outros esteróides ovarianos (BACKSTROM et al., 1974). E, as flutuações dos níveis de estrógenos e progesterona durante o ciclo menstrual podem estar relacionadas à maior suscetibilidade à depressão e à ansiedade de mulheres quando comparadas a homens (SEEMAN, 1997).

Os mecanismos pelos quais o estradiol e/ou a progesterona podem alterar a atividade neuronal incluem a modulação da síntese e do metabolismo de neurotransmissores (MEYER & QUAY, 1976), bem como do número e da atividade de receptores para agentes ansiolíticos e ansiogênicos (BIEGON et al., 1980; MAGGI & PERES, 1984; MAJEWSKA et al., 1986; MCCARTHY et al., 1996). Adicionalmente, efeitos rápidos e que não envolvem síntese protéica também são descritos como, por exemplo, a modulação dos receptores GABA_A no sistema nervoso central (TOUCHETTE, 1990; LAMBERT et al., 1995).

Assim sendo, e considerando que, em ratas, o estresse é acompanhado de alterações de sensibilidade do átrio direito às catecolaminas; que estas alterações podem estar relacionadas a variações nos níveis de corticosterona, e/ou progesterona, e/ou estradiol em resposta à exposição aos estímulos estressantes, as quais dependem da fase

do ciclo estral em que o animal é sacrificado; que a reação de estresse depende da natureza do estímulo estressor e da percepção deste estímulo pelo indivíduo, nosso objetivo neste trabalho é estudar os efeitos do estresse sobre os níveis de corticosterona, progesterona e estradiol em soro de ratas submetidas a estresse, considerando a influência do ciclo estral. Também tivemos por objetivo verificar se há relação entre estas variações hormonais e as alterações de sensibilidade às catecolaminas que nós observamos anteriormente em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é analisar a influência do ciclo estral sobre a resposta hormonal de ratas submetidas a estresse, e verificar se tal influência poderia estar relacionada às alterações de sensibilidade às catecolaminas previamente observadas em átrios direitos de ratas estressadas (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996).

Considerando também que a reação de estresse depende de como o indivíduo percebe o estímulo estressor, e que esta percepção pode ser alterada pela ansiedade, é nosso objetivo avaliar também o nível de ansiedade de ratas controles, nas diferentes fases do ciclo estral, para verificar se este fator poderia estar relacionado a diferenças nos padrões de variação hormonal entre o diestro e o estro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, com 3-4 meses, pesando entre 175 e 250 gramas, fornecidas pelo Centro de Biotério da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos no Departamento de Fisiologia e Biofísica, alojados em gaiolas coletivas, com 5 animais, no máximo, em cada gaiola, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), e com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 6:00 h). Receberam, durante todo o período, água e ração para ratos (Purina) à vontade.

3.2. Determinação das fases do ciclo estral

A determinação das fases do ciclo estral foi feita diariamente entre 7:00 e 8:00 h, por meio de esfregaço vaginal, durante oito dias consecutivos (dois ciclos), no mínimo. O lavado vaginal foi coletado com uma ponteira plástica preenchida com cerca de 10ml de soro fisiológico como ilustrado na Figura 1.

O material foi observado a fresco, ao microscópio óptico, utilizando-se aumento de 40 vezes. A proporção entre o número de células epiteliais nucleadas, células queratinizadas e leucócitos foi analisada e utilizada para classificação da fase do ciclo estral, de acordo com a Figura 2. O lavado constituído primariamente de células epiteliais nucleadas caracteriza a fase de proestro; maior proporção de células queratinizadas é observada durante o estro. A fase de diestro é caracterizada por maior proporção de leucócitos, enquanto durante a fase de metaestro observa-se a presença dos três tipos celulares em proporções semelhantes (YOUNG et al., 1941; MANDL, 1941; HOAR, 1975).

Desprezaram-se as ratas que apresentaram ciclos irregulares, caracterizados por ausência ou permanência em uma das fases além do período médio normal (DRICKAMER, 1987). Somente ratas apresentando ciclos de 4 dias (proestro, estro, metaestro, diestro) foram utilizadas (SMITH et al., 1973). Nos dias em que os animais foram submetidos a estresse, a fase do ciclo estral foi determinada imediatamente antes da realização do experimento.

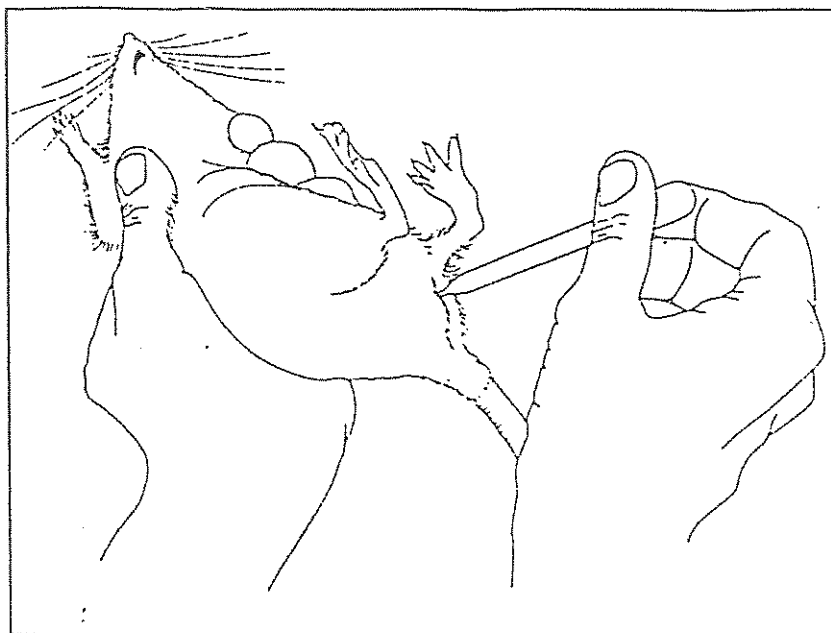


Figura 1. Método de coleta de lavado vaginal para determinação da fase do ciclo estral de ratas (HOAR, 1975).

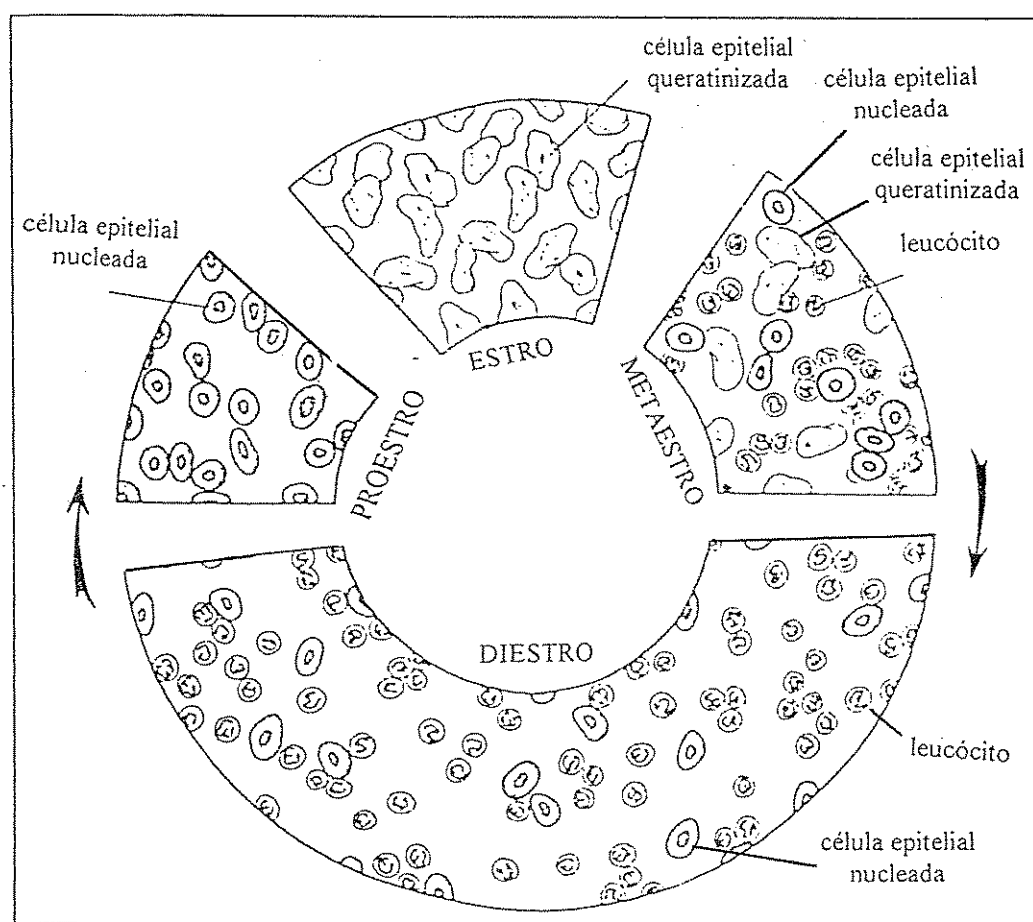


Figura 2. Células características do esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral de ratas (HOAR, 1975).

3.3. Estresse por choques nas patas

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a três sessões de choques nas patas não sinalizados e inescapáveis, entre 7:00 e 11:00h. As sessões, com duração de 30 minutos aproximadamente, foram aplicadas em dias consecutivos. Os choques foram aplicados em uma câmara de acrílico (26 x 21 x 26 cm), com piso constituído de barras cilíndricas de aço inoxidável, com 0,3 cm de diâmetro, espaçadas entre si por 1,0 cm (VANDERLEI et al., 1996; MARCONDES et al., 1996).

A aplicação dos choques obedeceu aos princípios descritos por HOFFMAN & FLESHLER (1962), utilizando-se um microprocessador construído pelo Departamento de Engenharia Biomédica da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Estadual de Campinas. A intensidade da corrente foi de 1,0 mA e a duração de 1,0 segundo. Cada rata recebeu 120 choques, distribuídos a intervalos aleatórios de 5 a 25 segundos, com intervalo médio de 15 segundos. Ao final de cada sessão, o animal retornou a sua gaiola moradia e, imediatamente após a terceira sessão de choques, foi sacrificado.

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

3.4. Estresse por natação

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos à natação em um tanque de vidro medindo 100x50x60 cm, contendo água a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, em uma profundidade 35 cm, suficiente para que os animais não apoiassem a cauda no fundo do tanque (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996). O estresse foi aplicado entre 7:00 e 11:00 h.

Os animais foram submetidos a três sessões de natação aplicadas em dias consecutivos, com duração de 5, 15 e 30 min, respectivamente. Após a primeira e a segunda sessões de natação (1^o e 2^o dias), os animais foram mantidos em ambiente

aquecido, onde permaneceram por cerca de 45 minutos, até estarem secos, retornando em seguida para suas gaiolas.

3.5. Coleta de sangue

Os animais foram sacrificados com um golpe na cabeça e secção dos vasos cervicais. O sangue foi coletado e, após coagulação, o soro foi separado e estocado em congelador para posterior dosagem hormonal.

3.6. Dosagens hormonais

Os níveis de corticosterona, progesterona e 17- β -estradiol (estradiol) foram determinados utilizando-se kits de radioimunoensaio (ICN Biomedicals). Para dosagem de corticosterona, 10 μ l de cada amostra foram diluídos em 200 μ l de diluente específico para esteróides. Foram utilizadas alíquotas de 100 μ l das soluções padrão e das amostras diluídas, em duplicata, às quais adicionaram-se 200 μ l da solução com hormônio marcado radioativamente (125 I-corticosterona). Em seguida, foram acrescentados 200 μ l da solução de anticorpo anti - corticosterona. Após agitação, os tubos foram incubados por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 500 μ l de solução precipitante e as amostras foram agitadas e centrifugadas, a 2500 rpm por 15 min, para precipitação dos complexos antígeno-anticorpo. O sobrenadante foi retirado e a radioatividade do precipitado foi determinada, em contador automático Beckman. A concentração de corticosterona nas amostras foi obtida utilizando-se curva padrão obtida em cada ensaio.

Para as dosagens de progesterona e estradiol, 100 μ l das soluções padrão e de cada amostra, em duplicata, foram adicionados aos respectivos tubos especiais recobertos por uma camada de anticorpos anti-progesterona e estradiol. A seguir, foi acrescentado 1ml de hormônio marcado radioativamente: 125 I-17 β -estradiol ou 125 I-progesterona. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por 2 horas para progesterona, e por 3 horas para o estradiol. Em seguida, os sobrenadantes foram

descartados, e a radioatividade dos tubos foi medida. As concentrações das amostras foram determinadas como descrito acima para a corticosterona. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram menores do que 10%.

3.7. Avaliação do nível de ansiedade de ratas

O nível de ansiedade de ratas foi avaliado por meio da análise do comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985). O labirinto, construído em madeira, apresenta altura de 50 cm acima do solo. Como está ilustrado na Figura 3, é formado por dois braços abertos, opostos entre si (50 x 10 cm), cruzando em ângulo reto dois braços fechados, também opostos entre si (50 x 10 cm), e com paredes de 40-cm de altura (PELLOW et al., 1985). A união dos quatro braços forma um quadrado central que mede 10 x 10 cm. Há uma margem de 1 cm de acrílico ao redor de cada braço aberto.

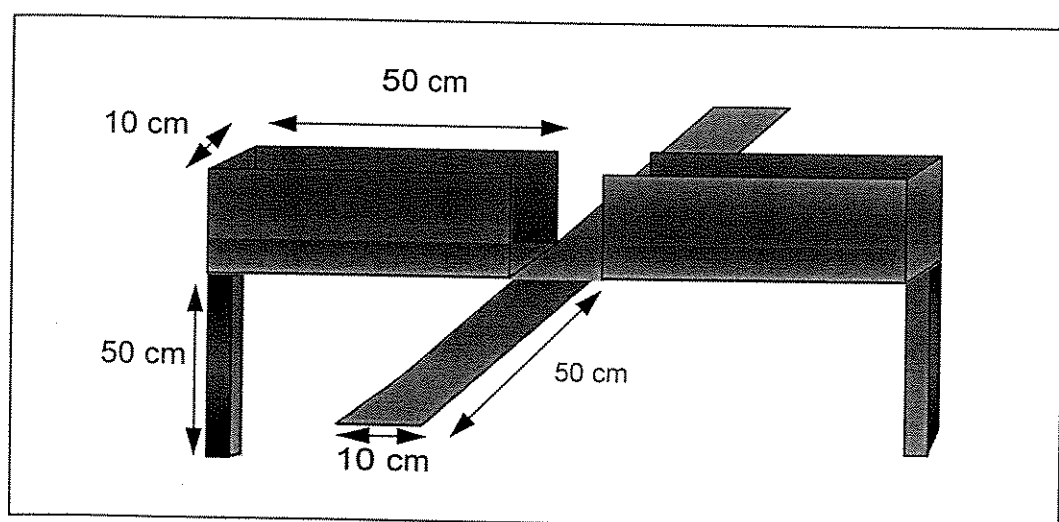


Figura 3. Modelo esquemático do labirinto em cruz elevado.

O teste do labirinto em cruz elevado constitui um modelo de conflito para o rato ou camundongo, onde a curiosidade em explorar os braços abertos se opõe à aversão gerada por espaços abertos. O medo dos braços abertos é motivado pela tigmotaxia, uma

resposta de defesa natural do animal que o leva a permanecer próximo a superfícies verticais, evitando desta forma ser visto pelo predador (TREIT & FUNDYTUS, 1989; TREIT et al., 1993).

Este modelo experimental apresenta alta sensibilidade para avaliação do efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, e está baseado no fato de que o tempo em que o animal permanece nos braços abertos está inversamente correlacionado ao seu nível de ansiedade (PELLOW et al., 1985).

O teste comportamental foi realizado trinta minutos após a determinação das fases do ciclo estral, quando os animais foram transportados até a sala de experimentação. Uma de cada vez, cada rata foi colocada no centro do labirinto, voltada para um dos braços fechados. Durante a duração do teste, que foi de 5 minutos, os seguintes parâmetros foram registrados: (a) número de entradas nos braços abertos, (b) número de entradas nos braços fechados, (c) tempo de exploração dos braços abertos, e (d) tempo de exploração dos braços fechados. Uma entrada em um braço foi contada quando o animal colocou as quatro patas no mesmo. Os registros foram feitos por um experimentador que permaneceu na sala adjacente, observando o animal através de uma janela guarnecida com vidro unilateral, espelhado, localizada na parede da sala de experimentação.

Os resultados foram convertidos em três medidas: porcentagem do número de entradas nos braços abertos ($100 \times \text{n}^\circ \text{ entradas nos braços abertos} / \text{n}^\circ \text{ total de entradas}$), porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos ($100 \times \text{tempo nos braços abertos} / \text{n}^\circ \text{ total de entradas}$), e número de entradas nos braços fechados. A porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos está inversamente relacionada com o nível de ansiedade do animal (PELLOW et al., 1985; CRUZ et al., 1984), enquanto a porcentagem do número de entradas nos braços abertos está relacionada tanto à ansiedade quanto à atividade locomotora (CRUZ et al., 1994). O número de entradas nos braços fechados constitui um índice da atividade locomotora geral do animal (CRUZ et al., 1994). Cada animal foi submetido ao teste somente uma vez, e a observadora era sempre a mesma pessoa. Os testes foram realizados entre 8 e 10h, e o labirinto foi limpo após cada observação.

3.8. Grupos experimentais

3.8.1. Resposta hormonal de ratas submetidas a estresse

Para avaliar a influência do ciclo estral sobre a resposta hormonal ao estresse, foram utilizadas ratas controles em estro ou diestro, e ratas submetidas a três sessões de natação ou choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro - GRUPO DIESTRO, ou durante o diestro, proestro e estro - GRUPO ESTRO (Figura 1).

De acordo com dados anteriores (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996), três sessões de choques nas patas ou natação não provocam alteração no ciclo reprodutivo. Assim sendo, os grupos controles foram formados de acordo com a fase do ciclo estral do grupo experimental no dia do sacrifício, como está indicado na Tabela 1.

Tabela 1. Fases do ciclo estral de ratas submetidas a estresse.

Grupos Experimentais	Fase do ciclo estral na 1ª, 2ª e 3ª sessões de choques nas patas ou natação	Grupos Controles
<i>DIESTRO</i>	Estro, Metaestro e Diestro	Diestro
<i>ESTRO</i>	Diestro, Proestro e Estro	Estro

3.8.2. Evolução temporal dos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas submetidas a estresse.

Para avaliar a influência do ciclo estral sobre o padrão temporal de variação dos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol, foram utilizadas ratas controles em proestro, estro, metaestro e diestro, e ratas submetidas a três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro - GRUPO DIESTRO, ou durante o diestro, proestro e estro - GRUPO ESTRO. Nos grupos submetidos a estresse, foram realizadas

coletas de sangue antes e após a aplicação de cada sessão de estresse, bem como 1h e 6h após a primeira e segunda sessões, conforme indicado na Tabela 2. Nos grupos controles, o sangue foi coletado no período da manhã, entre 7:00 e 11:30h, e no período da tarde, entre 17:00 e 18:00h (Tabela 2).

3.8.3. Nível de ansiedade de ratas.

Para avaliar a influência do ciclo estral sobre o nível de ansiedade de ratas foram utilizadas ratas controles em proestro, estro, metaestro e diestro, pela manhã, entre 8 e 10h.

3.9. Análise estatística

Os dados foram comparados utilizando-se Análise de Variância monofatorial, seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas de médias. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas ao nível de 5% (ZAR, 1984).

Para comparação dos níveis hormonais entre os períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), em cada fase do ciclo estral, foi utilizado teste “t” de Student para dados não pareados (ZAR, 1984).

Tabela 2. Grupos e fases do ciclo estral de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas.

Grupos Experimentais	Sessão de choques nas patas	Tempo de coleta de sangue, em relação à aplicação da sessão de choques	Fase do ciclo estral	Grupos Controles
<i>DIESTRO</i>	1 ^a	antes	E	E - manhã
	1 ^a	após	E	
	1 ^a	1h após	E	
	1 ^a	6h após	E	E - tarde
	2 ^a	antes	M	M - manhã
	2 ^a	após	M	
	2 ^a	1h após	M	
	2 ^a	6h após	M	M - tarde
	3 ^a	antes	D	D - manhã
	3 ^a	após	D	
	1 ^a	antes	D	D - manhã
	1 ^a	após	D	
<i>ESTRO</i>	1 ^a	1h após	D	
	1 ^a	6h após	D	D - tarde
	2 ^a	antes	P	P - manhã
	2 ^a	após	P	
	2 ^a	1h após	P	
	2 ^a	6h após	P	P - tarde
	3 ^a	antes	E	E - manhã
	3 ^a	após	E	

4. RESULTADOS

4.1. RESPOSTA HORMONAL DE RATAS SUBMETIDAS A ESTRESSE

Os níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas controles e de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas ou de natação estão apresentados na Figura 4 e nas Tabelas 3, 4 e 5.

Não houve diferença nos níveis hormonais entre ratas controle em estro e diestro (Figura 4, Tabelas 3 a 5).

Após três sessões de choques nas patas houve aumento de 2 - 2,5 vezes nos níveis séricos de corticosterona, que foi independente da fase do ciclo estral (Figura 4A). Após três sessões de natação observou-se maior elevação nos níveis de corticosterona em ratas sacrificadas no estro (3 vezes) do que no diestro (1.7 vez), em relação aos respectivos controles (Figura 4A, Tabela 3).

Houve aumentos semelhantes nos níveis séricos de progesterona (2 vezes) após três sessões de choques nas patas ou natação em ratas sacrificadas no diestro ou no estro (Figura 4B, Tabela 4).

Não foi observada alteração nos níveis séricos de estradiol após estresse por choques nas patas independentemente da fase do ciclo estral (Figura 4C, Tabela 5). Entretanto, a variação do nível de estradiol em resposta ao estresse por natação foi influenciada pelo ciclo estral. Houve aumento de 1,5 vez nos níveis séricos deste hormônio quando o sacrifício ocorreu no estro, sem alteração quando o mesmo ocorreu no diestro (Figura 4C, Tabela 5).

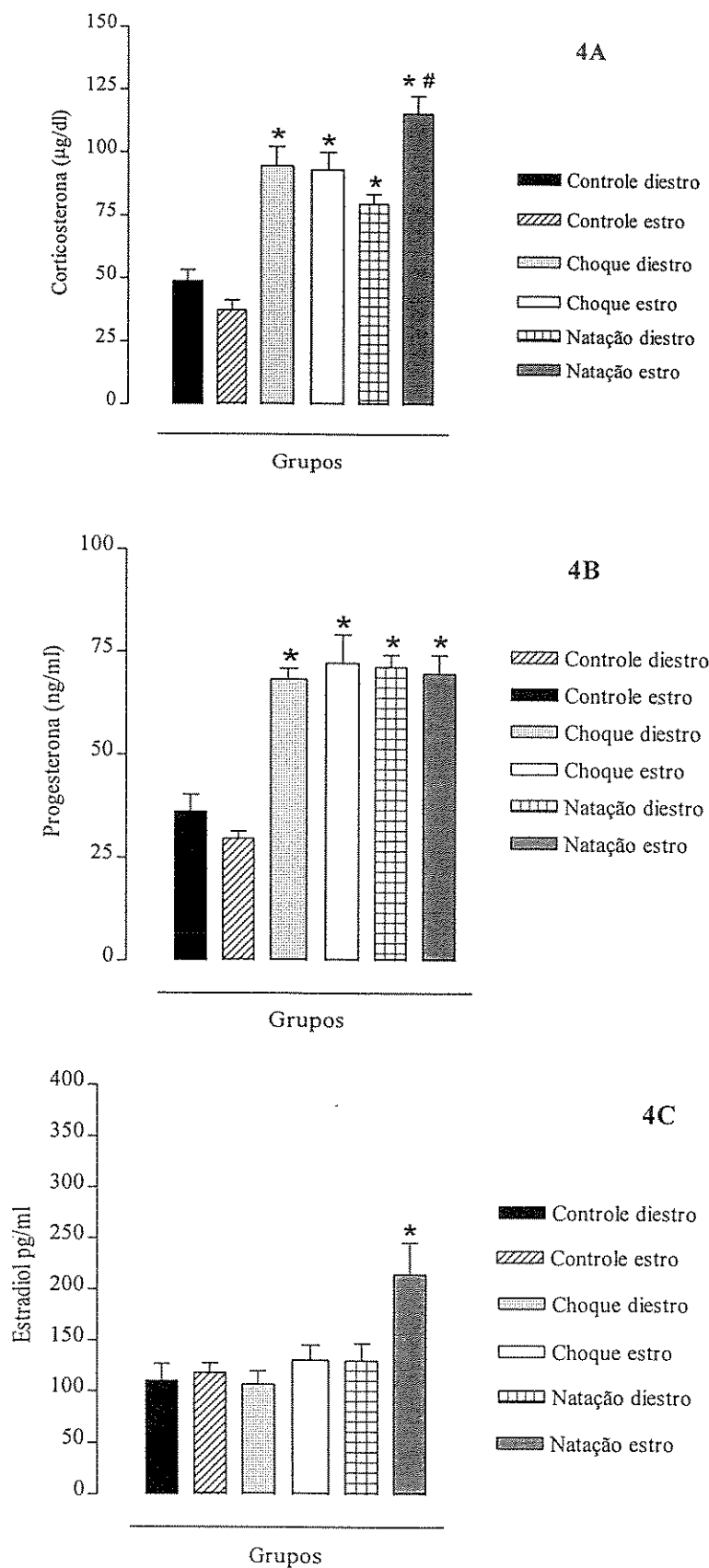


Figura 4. Níveis séricos de CORTICOSTERONA (4A), PROGESTERONA (4B) e ESTRADIOL (4C) de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas ou natação durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro) ou diestro, proestro e estro (grupo Estro). * Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). O número de experimentos / grupo está indicado nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Níveis séricos de CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dl}$) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e sacrificadas no diestro ou no estro.

Grupo	n ^a	Corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) ^b
Controle diestro ^c	32	48,93 $\pm$ 4,43
Controle estro ^d	37	37,57 $\pm$ 3,95
Choque diestro ^c	26	94,89 $\pm$ 7,57 *
Choque estro ^d	16	93,31 $\pm$ 7,00 *
Natação diestro ^c	20	79,98 $\pm$ 3,82 *
Natação estro ^d	14	115,74 $\pm$ 7,13 *#

^anúmero de experimentos. ^bmédia $\pm$ EPM. ^cRatas submetidas a três sessões de choques nas patas ou natação durante o estro, metaestro e diestro. ^dRatas submetidas a três sessões de choques nas patas ou natação durante o diestro, proestro e estro. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). # Diferença estatística em relação ao grupo natação diestro ($p < 0,05$).

Tabela 4. Níveis séricos de PROGESTERONA (ng/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e sacrificadas no diestro ou no estro.

Grupo	n ^a	Progesterona (ng/ml) ^b
Controle diestro ^c	30	36,22 $\pm$ 4,07
Controle estro ^d	14	29,67 $\pm$ 1,73
Choque diestro ^c	27	68,31 $\pm$ 2,63 *
Choque estro ^d	14	72,24 $\pm$ 6,90 *
Natação diestro ^c	17	71,26 $\pm$ 2,97 *
Natação estro ^d	15	69,67 $\pm$ 4,50 *

^anúmero de experimentos. ^bmédia $\pm$ EPM. ^cRatas submetidas a três sessões de choques nas patas ou natação durante o estro, metaestro e diestro. ^dRatas submetidas a três sessões de choques nas patas ou natação durante o diestro, proestro e estro. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 5. Níveis séricos de ESTRADIOL (pg/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas ou natação, e sacrificadas no diestro ou no estro.

Grupo	n ^a	Estradiol (pg/ml) ^b
Controle diestro ^c	24	110,50 $\pm$ 16,90
Controle estro ^d	23	118,60 $\pm$ 9,67
Choque diestro ^c	26	107,20 $\pm$ 12,98
Choque estro ^d	15	131,20 $\pm$ 14,61
Natação diestro ^c	17	130,60 $\pm$ 16,64
Natação estro ^d	14	215,20 $\pm$ 30,97 *

^anúmero de experimentos. ^bmédia $\pm$ EPM. ^cRatas submetidas a três sessões de choques nas patas ou natação durante o estro, metaestro e diestro. ^dRatas submetidas a três sessões de choques nas patas ou natação durante o diestro, proestro e estro. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

4.2. EVOLUÇÃO TEMPORAL DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA, PROGESTERONA E ESTRADIOL DE RATAS SUBMETIDAS A ESTRESSE

Os níveis séricos de corticosterona de ratas controles ou submetidas a estresse por choques nas patas são apresentados na Figura 5.

Ratas controles em cada fase do ciclo estral não apresentaram níveis séricos de corticosterona diferentes entre si, no período da manhã ou da tarde (Figura 5A). Porém, em cada uma das quatro fases do ciclo estral, os níveis de corticosterona no soro coletado entre 17 e 18h apresentaram-se, em média, 1,4 vezes maiores do que aqueles observados entre 7 e 11:30h (Figura 5A; Tabelas 6 e 7).

O padrão temporal de variação dos níveis séricos de corticosterona ao longo dos três dias em que os animais foram submetidos a estresse por choques nas patas está ilustrado nas Figuras 5B e 5C. Imediatamente após a primeira sessão de estresse, os níveis de corticosterona estavam aumentados em relação ao controle mas voltaram aos níveis basais já na primeira hora após a sessão de choques, nos grupos Diestro e Estro (Figuras 5B e 5C, respectivamente). No dia em que as ratas receberam a 1ª sessão de choques nas patas, ao contrário do observado em animais controles (Figura 5A), não houve elevação dos níveis de corticosterona ao final da tarde, 6h após o estresse, em relação aos níveis observados pela manhã, antes da aplicação dos choques (Figuras 5B e 5C, Tabelas 6 e 7).

No segundo dia de estresse, os níveis séricos de corticosterona no grupo Estro, antes da aplicação do estresse, apresentaram-se menores do que em ratas controles (Tabela 7). Diferentemente do padrão observado no primeiro dia, em ambos os grupos, os níveis deste hormônio encontravam-se elevados 6h após a aplicação dos choques (Figuras 5B e 5C), e foram maiores no grupo Estro do que no grupo Diestro.

No terceiro dia, antes da aplicação dos choques nas patas, em ambos os grupos Diestro e Estro, os níveis séricos de corticosterona encontravam-se menores do que aqueles observados em animais controles (Tabelas 6 e 7). Após a aplicação do estímulo estressante, estes níveis aumentaram de modo semelhante ao observado nos dias anteriores (Figuras 5B e 5C).

Em resumo, ocorrem algumas diferenças nas alterações de secreção de corticosterona em resposta ao estresse, dependendo da fase do ciclo em que os animais se encontram. No grupo Diestro, os níveis séricos de corticosterona aumentam após cada

sessão de choques, caem abaixo do normal imediatamente após e voltam aos níveis basais 6h após a sessão de choques nas patas (Figura 5B; Tabela. 6).

No grupo Estro, há aumento nos níveis séricos de corticosterona após cada uma das três sessões. Estes voltam aos níveis basais dentro da primeira hora. Seis horas após a primeira e segunda sessões de choques os níveis observados foram semelhantes aos de ratas controles no mesmo horário (Tabela 7). Antes da segunda e terceira sessões, os níveis foram menores do que em animais normais (Figura 5C; Tabela 7).

Não foram observadas diferenças nos níveis séricos de progesterona entre as fases do ciclo estral em soro de ratas controles quando a coleta de sangue ocorreu pela manhã (Figura 6A). Porém entre 17 e 18h, ratas em proestro apresentaram os níveis deste hormônio 2,9; 1,5 e 2,8 vezes maiores ($p < 0,05$) que aquelas em estro, metaestro e diestro, respectivamente. Durante o metaestro os níveis de progesterona foram 1,9 e 1,8 vezes maiores do que os obtidos durante o estro e o diestro, respectivamente (Figura 6A). Nestas duas fases foram observados os menores níveis de progesterona, no período vespertino, comparados com os níveis matutinos em qualquer fase. Ao contrário, no proestro, os níveis vespertinos foram maiores do que os matutinos (Figura 6A), sem alteração durante o metaestro (Figura 6A).

As alterações nos níveis séricos de progesterona em ratas submetidas a três sessões de choques nas patas estão apresentadas nas Tabelas 8 e 9 e na Figura 6. Em ambos os grupos, Diestro e Estro, houve aumento nos níveis do hormônio após a primeira sessão de estresse, seguido de diminuição 1h e 6h após a aplicação dos choques nas patas (Figuras 6B e 6C, respectivamente). No grupo Diestro este padrão se repete após a segunda sessão de choques nas patas.

Entretanto, no grupo Estro, os níveis séricos de progesterona voltaram aos valores normais apenas após a primeira sessão (Figura 6C, Tabela 9). Uma hora após a segunda sessão de estresse os níveis séricos de progesterona estão menores do que o normal ($p < 0,05$). Seis horas após, os níveis não diferem dos níveis observados em ratas controle na mesma fase e horário (Figura 6C).

É interessante notar que, neste grupo, os níveis séricos de progesterona observados antes da segunda e da terceira sessões foram significativamente menores do que o normal (Figura 6C; Tabela 9).

Os níveis séricos de estradiol de ratas controles e estressadas está apresentado na Figura 7 e nas Tabelas 10 e 11. Entre 7 e 11:30h, os níveis de estradiol em soro de ratas em proestro apresentaram-se 2,2; 2,7 e 2,5 vezes maiores do que aqueles de ratas em estro, metaestro e diestro, respectivamente (Figura 7A). Entretanto, entre 17 e 18h, somente houve aumento de 3,8 vezes no proestro em relação ao metaestro mas não em relação às outras fases do ciclo (Figura 7A). Os níveis séricos de estradiol observados à tarde foram menores que aqueles observados pela manhã, em qualquer das quatro fases do ciclo estral (Figura 7A).

Em resposta ao estresse por choques nas patas, ratas do grupo Diestro apresentaram diminuição nos níveis séricos de estradiol após a primeira e a segunda apresentações do estímulo estressor (Figura 7B, Tabela 10). Os níveis permaneceram diminuídos até 6h após cada sessão e antes da segunda sessão. Entretanto no terceiro dia, os níveis séricos de estradiol estão normais antes da sessão de estresse e não se alteram após a aplicação dos choques (Tabela 10).

No grupo Estro, não houve variação dos níveis deste hormônio em resposta à primeira sessão de choques nas patas (Figura 7C). Entretanto, 6h após o estresse, os níveis séricos de estradiol foram duas vezes maiores que os níveis séricos de estradiol em animais controle, na mesma fase e horário (Tabela 11). Além disso, embora os níveis matutinos de estradiol já fossem elevados em ratas controle, estes são mais altos ainda em ratas submetidas a choques, antes da segunda sessão; caem após o choque e permanecem baixos até o dia seguinte. Os níveis séricos de estradiol não se alteram após a terceira sessão de choques (Figura 7C; Tabela 11). Porém, antes da segunda sessão, ao contrário do que foi observado no grupo Diestro, os níveis séricos de estradiol apresentaram-se maiores do que em ratas controles (Tabela 11) e a aplicação dos choques nas patas induziu uma queda nestes níveis (Tabela 11, Figura 7C). Os níveis observados antes da segunda sessão, quando as ratas estavam em proestro, foram maiores do aqueles observados em animais controles (Tabela 11) mas caíram abaixo do controle após a sessão de choques, permanecendo diminuídos até 6h após.

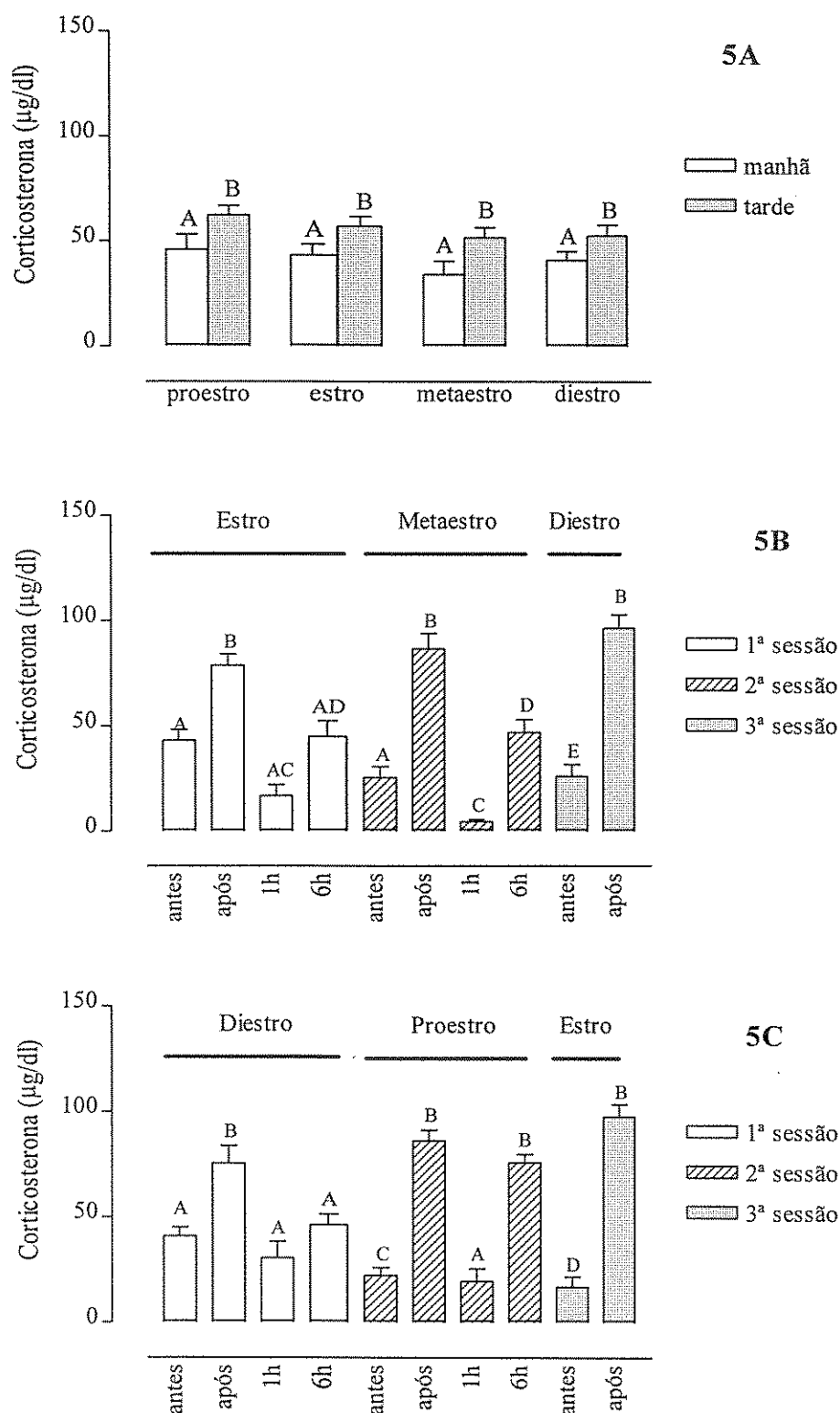


Figura 5. Níveis séricos de CORTICOSTERONA de ratas controles (5A) nas diferentes fases do ciclo estral, nos períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), e de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (5B - grupo Diestro) ou diestro, proestro e estro (5C - grupo Estro). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si, no mesmo gráfico ($p < 0,05$). O número de experimentos/grupo está indicado nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Níveis séricos de CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dl}$) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro).

Sessão	Tempo ^a	Fase do ciclo estral	Controle ^b	Choque ^b
1 ^a	após	Estro	43,24 $\pm$ 5,23	78,84 $\pm$ 5,31 *
1 ^a	1h	Estro	-	17,06 $\pm$ 5,26
1 ^a	6h	Estro	57,02 $\pm$ 4,81	45,15 $\pm$ 7,50
2 ^a	antes	Metaestro	34,09 $\pm$ 6,46	25,68 $\pm$ 5,23
2 ^a	após	Metaestro	-	86,87 $\pm$ 7,34
2 ^a	1h	Metaestro	-	4,66 $\pm$ 1,07
2 ^a	6h	Metaestro	51,65 $\pm$ 6,61	47,24 $\pm$ 6,04
3 ^a	antes	Diestro	40,89 $\pm$ 14,18	26,31 $\pm$ 5,57 *
3 ^a	após	Diestro	-	96,65 $\pm$ 6,41

número de experimentos = 13 ou 14. ^aTempo de coleta em relação à sessão de choques nas patas. ^bmédia $\pm$ EPM. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle.

Tabela 7. Níveis séricos de CORTICOSTERONA ($\mu\text{g/dl}$) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o diestro, proestro e estro (grupo Estro).

Sessão de estresse	Tempo ^a	Fase do ciclo estral	Controle ^b	Choque ^b
1 ^a	após	Diestro	40,89 $\pm$ 14,18	75,74 $\pm$ 8,29*
1 ^a	1h	Diestro	-	30,69 $\pm$ 7,81
1 ^a	6h	Diestro	52,64 $\pm$ 5,15	46,41 $\pm$ 5,16
2 ^a	antes	Proestro	45,93 $\pm$ 7,21	22,27 $\pm$ 3,81 *
2 ^a	após	Proestro	-	86,34 $\pm$ 5,09
2 ^a	1h	Proestro	-	19,70 $\pm$ 5,98
2 ^a	6h	Proestro	62,52 $\pm$ 4,39	75,93 $\pm$ 3,88
3 ^a	antes	Estro	43,24 $\pm$ 5,23	16,99 $\pm$ 4,74 *
3 ^a	após	Estro	-	97,72 $\pm$ 5,81

número de experimentos = 13 ou 14. ^aTempo de coleta em relação à sessão de choques nas patas. ^bmédia $\pm$ EPM. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle.

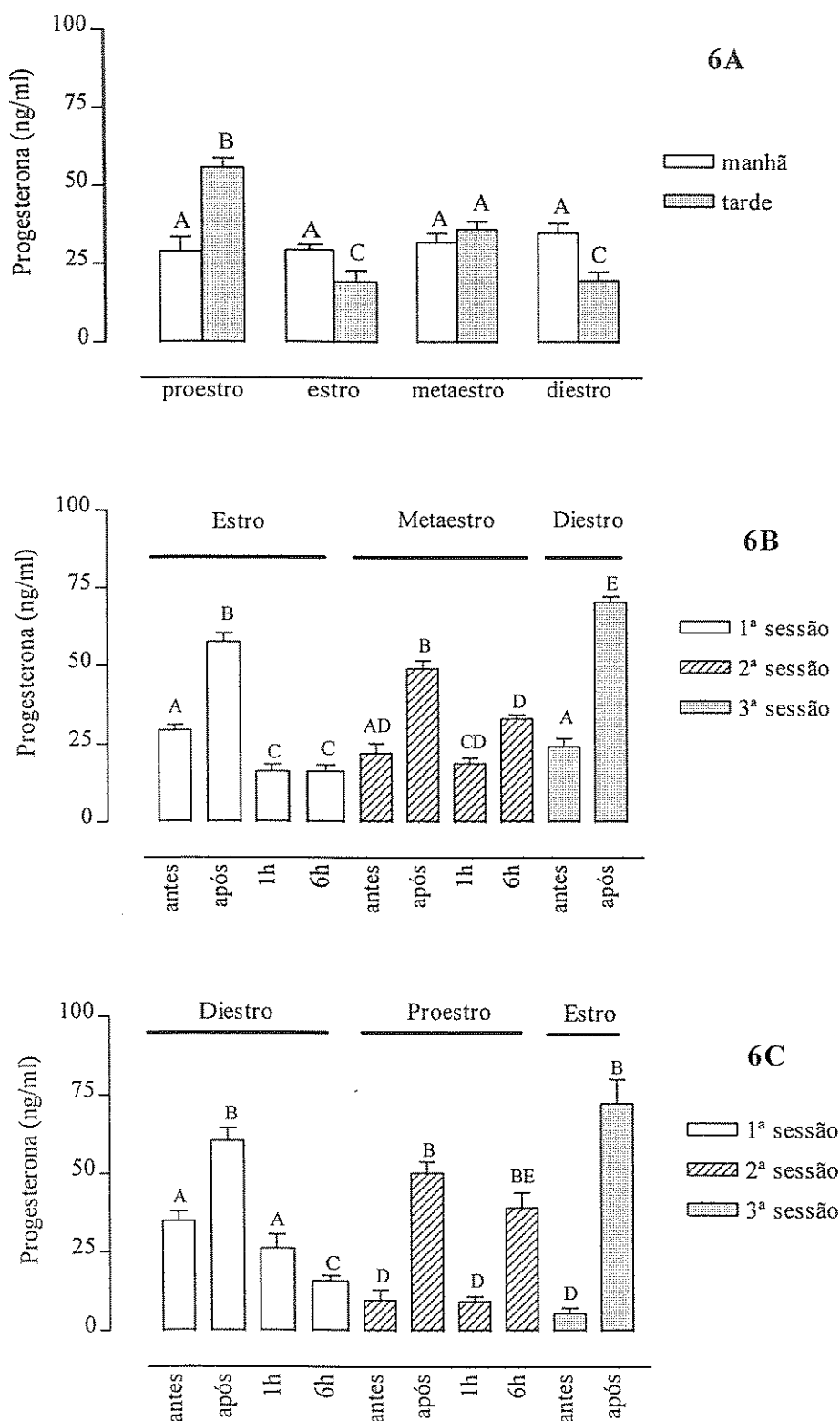


Figura 6. Níveis séricos de PROGESTERONA de ratas controles (6A) nas diferentes fases do ciclo estral, nos períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), e de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (6B -Diestro) ou diestro, proestro e estro (6C - Estro). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si, no mesmo gráfico ($p < 0,05$). O número de experimentos/grupo está indicado nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Níveis séricos de PROGESTERONA (ng/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro).

Sessão de estresse	Tempo ^a	Fase do ciclo estral	Controle ^b	Choque ^b
1 ^a	após	Estro	29,67±1,73	57,90 ± 2,73*
1 ^a	1h	Estro	-	16,62 ± 2,20
1 ^a	6h	Estro	19,48±3,43	16,62 ± 2,04
2 ^a	antes	Metaestro	32,10±2,94	22,46 ± 3,11
2 ^a	após	Metaestro	-	49,39 ± 2,58
2 ^a	1h	Metaestro	-	19,16 ± 1,77
2 ^a	6h	Metaestro	36,38±2,38	33,43 ± 1,27
3 ^a	antes	Diestro	35,14±3,13	24,64 ± 2,59
3 ^a	após	Diestro	-	70,66 ± 1,85

número de experimentos = 13 ou 14. ^aTempo de coleta em relação à sessão de choques nas patas. ^bmédia±EPM. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle.

Tabela 9. Níveis séricos de PROGESTERONA (ng/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o diestro, proestro e estro (grupo Estro).

Sessão de estresse	Tempo ^a	Fase do ciclo estral	Controle ^b	Choque ^b
1 ^a	após	Diestro	35,14 ± 3,13	60,76 ± 4,05*
1 ^a	1h	Diestro	-	26,47 ± 4,43
1 ^a	6h	Diestro	19,97 ± 2,68	16,08 ± 1,69
2 ^a	antes	Proestro	29,19 ± 4,54	10,00 ± 3,22*
2 ^a	após	Proestro	-	50,42 ± 3,67
2 ^a	1h	Proestro	-	9,58 ± 1,58
2 ^a	6h	Proestro	56,00 ± 3,02	39,40 ± 4,74
3 ^a	antes	Estro	29,67 ± 1,73	5,76 ± 1,75 *
3 ^a	após	Estro	-	72,59 ± 7,72

número de experimentos = 13 ou 14. ^aTempo de coleta em relação à sessão de choques nas patas. ^bmédia±EPM. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle.

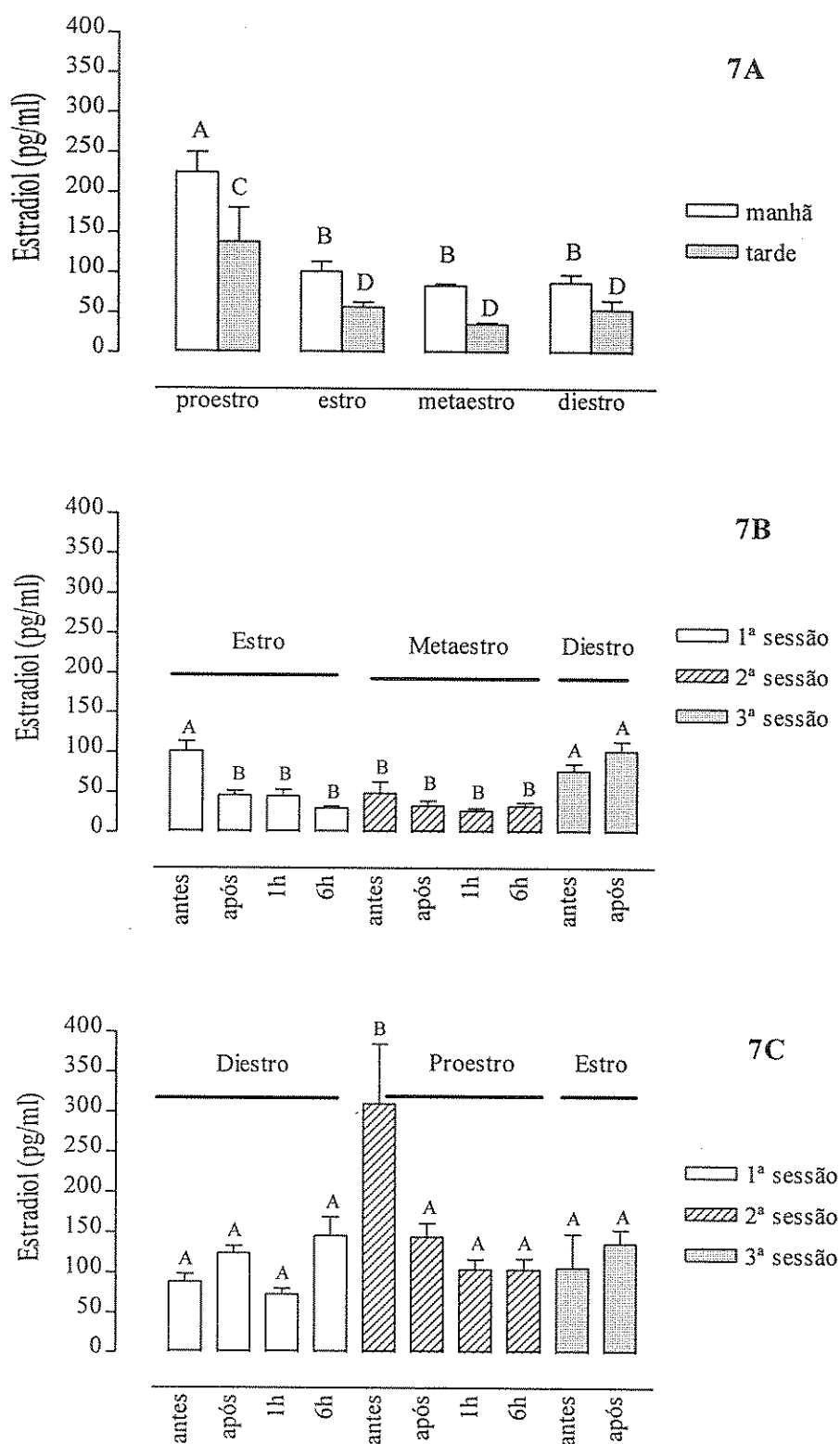


Figura 7. Níveis séricos de ESTRADIOL de ratas controles (7A) nas diferentes fases do ciclo estral, nos períodos da manhã (entre 7:00 e 11:30h) e tarde (entre 17:00 e 18:00h), e de ratas submetidas a estresse por três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (7B - Diestro) ou diestro, proestro e estro (7C - Estro). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes entre si, no mesmo gráfico ($p < 0,05$). O número de experimentos/grupo está indicado nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Níveis séricos de ESTRADIOL (pg/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (grupo Diestro).

Sessão de estresse	Tempo ^a	Fase do ciclo estral	Controle ^b	Choque ^b
1 ^a	após	Estro	102,20 ± 12,23	46,94 ± 5,41 *
1 ^a	1h	Estro	-	45,78 ± 8,01
1 ^a	6h	Estro	57,82 ± 6,20	30,61 ± 2,63 *
2 ^a	antes	Metaestro	84,60 ± 2,75	49,43 ± 14,02 *
2 ^a	após	Metaestro	-	33,69 ± 6,10
2 ^a	1h	Metaestro	-	27,51 ± 2,94
2 ^a	6h	Metaestro	36,46 ± 2,27	33,33 ± 4,17
3 ^a	antes	Diestro	88,90 ± 9,75	77,84 ± 8,57
3 ^a	após	Diestro	-	102,40 ± 11,86

número de experimentos = 13 ou 14. ^aTempo de coleta em relação à sessão de choques nas patas. ^bmédia±EPM. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle.

Tabela 11. Níveis séricos de ESTRADIOL (pg/ml) de ratas submetidas a estresse por choques nas patas durante o diestro, proestro e estro (grupo Estro).

Sessão de estresse	Tempo ^a	Fase do ciclo estral	Controle ^b	Choque ^b
1 ^a	após	Diestro	88,90 ± 9,75	124,60 ± 9,75
1 ^a	1h	Diestro	-	73,54 ± 6,92
1 ^a	6h	Diestro	54,63 ± 11,90	146,40 ± 23,50*
2 ^a	antes	Proestro	225,40 ± 25,23	310,80 ± 34,67*
2 ^a	após	Proestro	-	145,00 ± 17,0
2 ^a	1h	Proestro	-	104,70 ± 12,60
2 ^a	6h	Proestro	139,00 ± 42,30	104,70 ± 13,37
3 ^a	antes	Estro	102,20 ± 12,23	106,70 ± 42,02
3 ^a	após	Estro	-	136,90 ± 17,0

número de experimentos = 13 ou 14. ^aTempo de coleta em relação à sessão de choques nas patas. ^bmédia±EPM. *Diferença estatística em relação ao respectivo grupo controle.

4. 3. NÍVEL DE ANSIEDADE DE RATAS

O nível de ansiedade de ratas foi avaliado por meio da análise de seu comportamento no labirinto em cruz elevado (Figura 8). Ratas em proestro apresentaram maior tempo de exploração dos braços abertos do que ratas em diestro (Figura 8A).

A porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 8B) ou fechados (Figura 8C) não variou entre as fases do ciclo estral.

Estes resultados indicam que ratas em proestro apresentam menores níveis de ansiedade do que ratas em diestro.

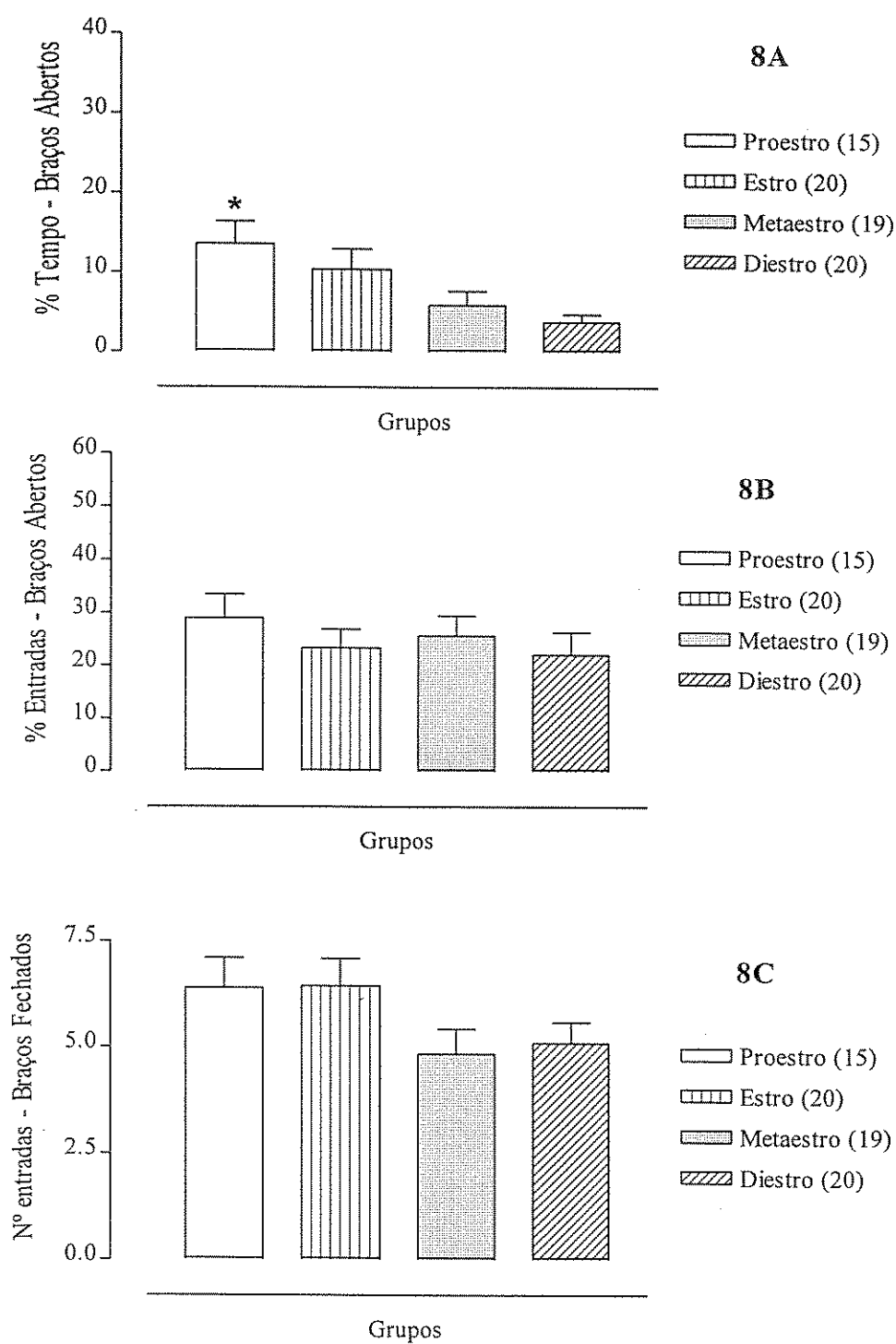


Figura 8. Porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos (8A), porcentagem do número de entradas realizadas nos braços abertos (8B) e número de entradas realizadas nos braços fechados (8C) por ratas submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado nas quatro fases do ciclo estral. *Diferença estatística em relação ao grupo diestro ($p < 0,05$). O número de experimentos / grupo está indicado entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

A reação de estresse compreende as inúmeras alterações fisiológicas que ocorrem nos organismos vivos em resposta a estímulos que representem ameaça a sua homeostasia, entre os quais podem ser citados estímulos ambientais, físicos, psicológicos ou sociais (SELYE, 1936; GRIFFIN, 1989; CHROUSOS & GOLD, 1992; FRANKS, 1994).

A exposição de um indivíduo a um estímulo desconhecido ou aversivo provoca ativação do eixo sistema nervoso simpático - medula adrenal e do eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal aumentando a secreção de catecolaminas e de glicocorticóides, respectivamente (SELYE, 1936). A função destas alterações endócrinas é promover o redirecionamento das substâncias que são fontes de energia para as células, carboidratos e lipídios principalmente, e determinar ajustes dos sistemas cardiovascular, respiratório, nervoso e muscular para manutenção da homeostase durante o comportamento de luta ou fuga, característico da reação de estresse (SELYE, 1936; HERD, 1991; YAMAGUCHI, 1992). Se a situação estressante se mantém ou se repete, estes mesmos hormônios desencadeiam os processos adaptativos que permitem a convivência com a situação aversiva.

Para o estudo da reação de estresse em ratos de laboratório, diferentes modelos experimentais são utilizados, tais como imobilização, choques nas patas, ruídos intensos e natação.

A natação, além de representar um agente estressante por seu componente físico, apresenta um forte componente emocional, relacionado à novidade que este estímulo representa para o animal e à impossibilidade de fuga, somada à iminência de morte (ÖSTMAN-SMITH, 1979; GARCIA-MARQUEZ & ARMARIO, 1987; MARCONDES et al., 1996). Ao ser colocado na água pela primeira vez, o rato rapidamente passa a nadar em torno das bordas do tanque, aparentemente procurando escapar. Depois de alguns minutos seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, o maior tempo possível (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996; IWAMOTO & MARCONDES, 1998).

Choques nas patas constituem um agente estressor por apresentarem um componente físico representado pela sensação dolorosa, bem como um componente

emocional, devido à imprevisibilidade da apresentação do estímulo (MARCONDES et al., 1996).

Assim sendo, os dois estímulos estressantes utilizados apresentam diferenças importantes que resultam em diferentes respostas a nível celular, como foi observado ocorrer nas alterações de sensibilidade às catecolaminas, em tecidos periféricos de ratos machos submetidos ao frio (CALLIA, 1981); à imobilização (CAPAZ & DE MORAES, 1988), a choques nas patas (BASSANI & DE MORAES, 1986; FARIAS-SILVA et al., 1998) ou à natação (SPADARI et al., 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988;).

Em átrios direitos isolados de ratas, as alterações de sensibilidade às catecolaminas induzidas por estresse somente ocorrem quando o animal é sacrificado na fase de diestro, não sendo observadas quando o sacrifício ocorre durante o estro (MARCONDES, 1995; VANDERLEI et al., 1996; MARCONDES et al., 1996; SPADARI-BRATFISCH et al. 1998).

Em ratos machos, o desenvolvimento das alterações de sensibilidade, no marcapasso cardíaco isolado, foram dependentes do aumento dos níveis plasmáticos de corticosteorona induzido pela exposição aos estímulos estressores (SPADARI et al., 1988; NOURANI et al., 1992). Entretanto em ratas, além da corticosterona, outros fatores parecem estar envolvidos na indução de tais alterações (MARCONDES, 1995; SANTOS, 1998).

Como já foi demonstrado que a progesterona e o estradiol modulam a densidade e atividade dos receptores adrenérgicos em diferentes tecidos (KRALL et al., 1978; ROBERTS et al., 1977; LEVIN et al., 1980; CONDON et al., 1989) e que a exposição a diferentes estímulos estressores podem alterar seus níveis sanguíneos (NEQUIN & SCHWARTZ, 1971; BOEHM et al., 1982; BRUCE et al., 1984; BRUCE et al., 1984; DEIS et al., 1989; MacNIVEN et al., 1992), estes hormônios poderiam estar relacionados às alterações de sensibilidade às catecolaminas observadas em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse.

Neste trabalho, tivemos por objetivo avaliar como o ciclo estral e o tipo de estresse influenciam os níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas, a fim de verificar se havia alguma correlação entre suas concentrações sanguíneas e o desenvolvimento das alterações de sensibilidade adrenérgica previamente observadas em

átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998).

A reação de estresse é caracterizada por uma elevação nos níveis plasmáticos das catecolaminas e dos glicocorticóides, que por esta razão são utilizados como índices de estresse (SELYE, 1936; VAN DER KAR et al., 1991). Os aumentos nos níveis séricos de corticosterona observados após a aplicação de três sessões de choques nas patas ou de natação e apresentados na Figura 4A confirmam que estes protocolos constituem estímulos estressantes.

Entre os vários fatores que influenciam as variações hormonais durante a reação de estresse, merecem destaque a qualidade do agente estressor (MASON, 1968a, 1968b; HENNESSY et al., 1979) e o ciclo estral (BARON & BRUSH, 1979; POLLARD et al., 1975; VIAU & MEANEY, 1991).

Nossos dados mostraram que ratas submetidas a estresse com início durante o diestro, segunda sessão no proestro e terceira sessão seguida de sacrifício no estro, apresentaram maiores aumentos dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse por natação (Figura 4A) do que em resposta ao estresse por choques nas patas (Figura 4A). Não houve diferenças entre os estímulos quando as ratas foram sacrificadas durante o diestro (Figura 4A). Estes dados mostram que a reação de estresse, em ratas, dependem da interação entre o tipo de agente estressor e o ciclo estral.

Ao contrário, o ciclo estral não influenciou o aumento dos níveis séricos de corticosterona após três sessões de choques nas patas (Figura 4A, Tabela 3). Portanto, a influência do ciclo estral sobre o aumento na secreção de corticosterona induzido pelo estresse é dependente da qualidade do estímulo estressor.

Vários autores demonstraram que durante a reação de estresse, além de modificações na secreção dos glicocorticóides e das catecolaminas, a secreção de vários outros hormônios pode também ser alterada, como por exemplo os hormônios do crescimento (KRULICH et al., 1974; SEGGIE & BROWN, 1975; HOKFELT et al., 1983), luteinizante (KRULICH et al., 1974; EUKER et al., 1975), folículo-estimulante (KRULICH et al., 1974), prolactina (EUKER et al., 1975; SEGGIE & BROWN, 1975), angiotensina (VAN DER KAR, 1991), progesterona (NEQUIN & SCHWARTZ, 1971; PLAS-ROSER & ARON, 1977; BRUCE et al., 1981; BOEHM et al., 1982; BRUCE et al., 1984) e estradiol (MacNIVEN, 1992).

Em nossos resultados, observamos que ambos os estímulos estressantes, os choques nas patas e a natação, induziram uma elevação de cerca de 2 vezes nos níveis séricos de progesterona em relação aos níveis basais, e que este efeito foi independente da fase do ciclo estral (Figura 4B; Tabela 4). Não houve alteração nos níveis de estradiol após a aplicação das sessões de choques nas patas (Figura 4C; Tabela 5). Porém em resposta às sessões de natação, o ciclo estral influenciou a alteração dos níveis deste hormônio, que se apresentaram elevados quando as ratas foram estressadas durante o diestro, proestro e estro, mas não foram alterados quando as ratas encontravam-se em estro, metaestro e diestro (Figura 4C; Tabela 5).

Assim como as modificações nos níveis séricos de corticosterona, as alterações nos níveis de progesterona e estradiol durante a reação de estresse também foram dependentes da interação entre a qualidade do agente estressor e a fase do ciclo estral em que o mesmo era aplicado.

Estas alterações nos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol poderiam estar relacionadas com as alterações de sensibilidade da resposta cronotrópica às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratas submetidas a estresse e sacrificadas no diestro, pois os mesmos são importantes moduladores dos adrenocetores- β , os quais medeiam o controle da frequência cardíaca pela noradrenalina e adrenalina (ROBERTS et al., 1977; FREGLY et al., 1978; ROBERTS et al., 1979; LEVIN et al., 1980; ROBERTS et al., 1981; KANO, 1982; MOAWAD et al., 1982; DAVIES & LEFKOWITZ, 1984; MALBON & HADCOCK, 1988; KLANGKALYA & CHAN, 1988; HATJIS et al., 1988; CONDON et al., 1989).

De acordo com os resultados obtidos, a corticosterona e a progesterona, cujos níveis aumentaram em resposta aos choques nas patas e à natação, nos mesmos grupos que haviam apresentado alterações de sensibilidade adrenérgica (MARCONDES et al. 1996), poderiam estar participando das mesmas. Porém, estes hormônios também encontravam-se elevados nos grupos em que as alterações no marcapasso cardíaco não foram observadas (diestro, proestro e estro – MARCONDES et al., 1996). Portanto, os resultados acima não parecem esclarecer os fatores que determinam a diferença entre ratas sacrificadas em diestro e em estro quanto às alterações no tecido cardíaco induzidas por estresse.

O aumento observado nos níveis de estradiol em ratas sacrificadas no estro após a aplicação de três sessões de natação poderia impedir as alterações da resposta cronotrópica

às catecolaminas nestes animais (MARCONDES et al., 1996). Porém, os níveis de estradiol não foram modificados em ratas submetidas a choques nas patas e sacrificadas nesta fase do ciclo estral, quando também não houve alterações no marcapasso cardíaco (MARCONDES et al. 1996).

Portanto, a análise dos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol, hormônios imediatamente após a terceira sessão de estresse, no mesmo momento em que os experimentos farmacológicos haviam sido realizados (MARCONDES, 1995; MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI, 1996; VANDERLEI et al., 1996) não esclarecera a causa da ocorrência de alterações de sensibilidade adrenérgica do marcapasso cardíaco isolado de ratas submetidas a três sessões de estresse, e sacrificadas durante o diestro, e a ausência das mesmas quando o sacrifício ocorre no estro. Porém, sugerem que a elevação nos níveis séricos de corticosterona e progesterona poderiam estar envolvidas no processo.

Os mecanismos envolvidos com o aparecimento de subsensibilidade à noradrenalina e à adrenalina em átrios direitos isolados de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas foram melhor estudados do que aqueles relacionados com as alterações em resposta a três sessões de natação. Assim como em átrios direitos (BASSANI & DE MORAES, 1986; 1987) e adipócitos (FARIAS-SILVA et al., 1998) isolados de ratos machos, muitas são as evidências de que os choques nas patas aplicados durante o estro, metaestro e diestro induziram a participação dos adrenoreceptores do subtipo β_2 na resposta às catecolaminas (VANDERLEI et al., 1996; SANTOS, 1998; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998).

Os hormônios esteróides exercem suas ações através da interação com receptores intracelulares e consequente alteração da expressão gênica e regulação da síntese protéica (McCARTHY et al. 1996), e este processo requer minutos ou horas para acontecer (MAK et al., 1995). Com base nestas informações, o aumento na participação dos adrenoreceptores- β_2 em átrios direitos isolados de ratas estressadas, e sacrificadas no diestro, poderia ser resultante das alterações hormonais ocorridas após a primeira e segunda sessões de choques nas patas, não sendo provavelmente determinado somente pelas alterações nos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol observadas imediatamente após a terceira e última sessão (Figura 4).

Durante o ciclo estral, que dura quatro dias, ocorrem alterações nos níveis de corticosterona, progesterona e estradiol devidos ao ciclo circadiano e/ou ao ciclo estral (FREEMAN, 1988). A aplicação das sessões de estresse, estende-se por três dias. Logo, as alterações de sensibilidade adrenérgica detectadas no terceiro dia poderiam ser também resultantes de alterações nestes padrões diários e cíclicos de variação nos níveis destes hormônio durante os três dias em que os choques nas patas são aplicados.

Assim sendo, analisamos a evolução temporal das alterações nos níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas no primeiro, segundo e terceiro dias em que as mesmas eram submetidas a choques nas patas (Figuras 5, 6 e 7).

O estresse por choques nas patas realmente alterou o padrão dos níveis hormonais em relação aos controles em diferentes momentos ao longo do período de três dias, e não somente após a última sessão.

Em ambos os grupos, Diestro e Estro, a elevação dos níveis de corticosterona ao final da tarde em relação aos níveis matutinos não foi observada no dia em que a primeira sessão de choques nas patas foi aplicada (Figura 5B e 5C, Tabelas 6 e 7). Antes da aplicação da última sessão de choques, no terceiro dia, no grupo experimental em que as ratas encontravam-se na fase de diestro, os níveis séricos de corticosterona apresentaram-se menores do que os níveis matutinos de ratas controles na mesma fase do ciclo estral (Tabela 6). O mesmo foi observado no grupo em que as ratas encontravam-se na fase de estro antes da última sessão de estresse (Tabela 7).

Em resposta ao estresse, o padrão de variação dos níveis séricos de corticosterona variaram em ratas submetidas às três sessões de choques com início no estro, aplicação da segunda sessão no metaestro e sacrifício no diestro não diferiu daquele observado em ratas submetidas à primeira sessão durante o diestro, segunda na fase de proestro e sacrifício no estro (Figuras 5B e 5C).

Portanto, não houve diferença significativa entre a variação nos níveis de corticosterona observada em ratas submetidas a estresse que apresentam alterações de sensibilidade adrenérgica no átrio direito isolado (Grupo Diestro) e aquelas em que tais alterações não ocorrem (Grupo Estro).

Quanto à progesterona, observamos que no grupo Estro, antes da aplicação da segunda e terceira sessões de choques nas patas, quando as ratas encontravam-se nas fases de proestro e estro, respectivamente, os mesmos apresentaram-se menores do que aqueles

observados, pela manhã, em ratas controles nas mesmas fases do ciclo estral (Figuras 6A e 6C; Tabela 9). Não houve alteração no Diestro (Figuras 6A e 6B, Tabela 9).

Aparentemente houve diferença entre os grupos também em resposta à segunda sessão de choques nas patas. No grupo Diestro, 6h após a segunda aplicação dos choques, os níveis séricos de progesterona eram semelhantes aqueles observados pela manhã, antes da apresentação do estímulo estressor (Figura 6B). E no grupo Estro, 6h após a segunda aplicação dos choques nas patas, os níveis séricos de progesterona apresentavam-se elevados em relação aqueles observados pela manhã (Figura 6C). Entretanto, 6h após a segunda sessão de choques nas patas, portanto entre 17 e 18h, ratas do grupo Estro encontravam-se no final da tarde do proestro, momento em que ratas controles apresentaram altos níveis de progesterona em relação às demais fases do ciclo reprodutivo. Logo, o estresse não alterou este padrão cíclico de variação dos níveis séricos da progesterona, estando este aumento relacionado primariamente ao ciclo estral e não ao estresse.

Em resumo, a principal diferença entre ratas estressadas e sacrificadas no Diestro ou no Estro, foi a diminuição dos níveis séricos de progesterona antes da segunda e terceira sessões no grupo Estro, quando as alterações de sensibilidade adrenérgica não ocorrem, enquanto que na fase em que as mesmas são evidenciadas, não houve alteração do padrão observado em animais controles.

Os níveis séricos de estradiol diminuíram em resposta à primeira sessão de choques em ratas do grupo Diestro, voltando aos níveis basais no terceiro dia, antes da aplicação da terceira sessão (Figura 7B). No grupo Estro não houve influência direta do estresse sobre os níveis do estradiol, pois só foi observado um aumento dos níveis deste hormônio antes da segunda sessão de choques nas patas (Figura 7C). Neste momento, estas ratas encontravam-se na manhã do proestro, quando os níveis de estradiol também apresentaram-se maiores do que nas outras fases, em animais controles (Figura 7A). Logo, esta elevação parece estar principalmente relacionada ao ciclo estral. Porém destaca-se que em ratas estressadas os níveis deste hormônio foram maiores do que aqueles observados em ratas controles, na manhã do proestro (Tabela 11).

Quando comparadas a ratas controles, ratas estressadas do grupo Diestro apresentaram diminuição nos níveis de estradiol antes da segunda sessão de choques nas patas, quando se encontravam na fase de metaestro (Tabela 10).

Portanto a principal diferença hormonal entre ratas submetidas a três sessões de choques nas patas durante o estro, metaestro e diestro (Grupo Diestro) e ratas submetidas a este protocolo durante diestro, proestro e estro (Grupo Estro) foi a queda nos níveis de estradiol no primeiro grupo, sem variação no segundo. Logo, ocorreu diminuição nos níveis de estradiol quando as alterações de sensibilidade adrenérgica no marcapasso isolado haviam sido detectadas – Grupo Diestro (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996; SANTOS, 1998; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998), sem alteração no grupo em que não as mesmas não ocorrem – Grupo Estro (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996; SANTOS, 1998; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998).

Destacamos também as alterações nos níveis de corticosterona, progesterona e estradiol em relação a ratas controles, demonstrando que o estresse alterou em algumas vezes o padrão de variação destes hormônios durante o ciclo estral e/ou o ciclo circadiano.

Assim sendo podemos sugerir que, provavelmente, ocorre participação destes hormônios sobre as alterações de sensibilidade induzidas por estresse e que esta participação seria um processo complexo que envolve todo o período em que o protocolo de estresse é aplicado.

Um fator que poderia estar participando também das alterações hormonais acima é a variação da percepção do estímulo estressor pelo indivíduo (GRIFFIN, 1989; MARWITZ & STEMMLER, 1998). Ou seja, se houvesse maior ou menor ativação destas respostas dependendo da fase do ciclo estral da rata, no momento de aplicação de cada uma das sessões de choques nas patas, então algumas das diferenças nas respostas hormonais observadas entre os grupos Diestro e Estro poderiam ser melhor compreendidas.

A ansiedade tem um importante papel na ativação de vias nervosas encefálicas que regulam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta a estresse (Van GOOZEN et al., 1998) e que modulam sensações dolorosas (WIDERSTROM et al., 1998).

Realizamos experimentos comportamentais, com a finalidade de avaliar o nível de ansiedade em ratas controles, nas quatro fases do ciclo estral, pois a ansiedade poderia influenciar a ativação da secreção dos glicocorticóides e esteróides sexuais. Observamos que, durante o proestro, ratas controles apresentam-se com menor grau de ansiedade do que durante o diestro (Figura 8).

De acordo com o dado acima, no grupo que foi submetido às três sessões de choques durante o estro, metaestro e diestro, as ratas não apresentavam variação do nível de

ansiedade ao longo dos três dias em que as sessões de choques eram aplicadas. Entretanto no grupo submetido a estresse durante o diestro, proestro e estro a segunda sessão de estresse foi aplicada quando o nível de ansiedade da rata estava baixo, durante o proestro (Figura 8). E este menor nível de ansiedade foi simultâneo ao aumento nos níveis de estradiol em relação as outras fases do ciclo estral em animais controles (Figura 7A).

NEUMANN et al. (1998) demonstraram que no 15º dia de gravidez, ratas apresentam menor ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta a estresse. Os autores sugeriram que isto estaria relacionado com uma adaptação fisiológica a nível adenohipofisário, bem como com alterações na percepção do estressor em níveis cerebrais superiores, à medida que a gravidez progride (NEUMANN et al., 1998).

Já foi demonstrado, em humanos, que a ansiedade induz maiores aumentos de frequência cardíaca em resposta a estressores em comparação a indivíduos normais (FRIEDMAN & THAYER, 1998). Os autores discutem a ocorrência de baixo tônus vagal sobre o tecido cardíaco destes pacientes, determinado pelo alto nível de ansiedade dos mesmos (FRIEDMAN & THAYER, 1998).

Em nossos resultados, observamos uma queda nos níveis matutinos de corticosterona e de progesterona, antes da aplicação da segunda sessão de choques, em ratas do grupo Estro em relação a ratas controles (Tabelas 7 e 9). Isto ocorreu na manhã do proestro, quando também foram detectados menores níveis de ansiedade (Figura 8A). Esta queda dos níveis de corticosterona e progesterona poderia ser importante para o não desenvolvimento das alterações de sensibilidade adrenérgica no marcapasso isolado de ratas estressadas durante o diestro, proestro e estro.

Por outro lado, a manutenção de níveis séricos de corticosterona e progesterona semelhantes aos de animais controles, na manhã do metaestro, em ratas estressadas durante o estro, metaestro e diestro poderia ser importante na indução das alterações observadas em átrio direito isolado de ratas submetidas a três sessões de choques e sacrificadas durante o diestro.

Não sabemos como estas variações poderiam determinar ou não as alterações de sensibilidade adrenérgica, porém elas determinam diferentes proporções entre as concentrações de corticosterona, progesterona e estradiol. E já foi demonstrado que os efeitos da progesterona e estradiol, isoladamente ou em conjunto, dependem da razão entre os mesmos (WEILAND & WEISE, 1989).

Concluindo, nossos dados parecem sugerir que o aumento nos níveis de corticosterona e progesterona, acompanhado de uma queda nos níveis de estradiol, em ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, durante o estro, metaestro e diestro, poderia determinar o aparecimento das alterações de sensibilidade adrenérgica previamente relatadas nesse grupo experimental (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998).

Por outro lado, a não variação dos níveis de estradiol em resposta às sessões de choques, e o menor nível de ansiedade antes da aplicação da segunda sessão, poderiam ser os fatores que evitariam o surgimento de alterações de sensibilidade adrenérgica em marcapasso isolado de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas aplicadas durante o diestro, proestro e estro (MARCONDES et al., 1996; VANDERLEI et al., 1996; SPADARI-BRATFISCH et al., 1998).

6. CONCLUSÕES

1. A influência do ciclo estral sobre os níveis de corticosterona, progesterona e estradiol de ratas submetidas a três sessões de natação ou de choques nas patas é dependente da qualidade do agente estressor.

2. As alterações do níveis séricos de corticosterona, progesterona e estradiol, observadas após a terceira sessão de natação ou choques nas patas, não esclarecem a causa da ocorrência de alterações de sensibilidade adrenérgica do marcapasso cardíaco isolado de ratas submetidas a três sessões de estresse, e sacrificadas durante o diestro, e a ausência das mesmas quando o sacrifício ocorre no estro. Porém, sugerem que a elevação nos níveis séricos de corticosterona e progesterona poderiam estar envolvidas no processo.

3. Em ratas, o nível de ansiedade é menor durante a fase de proestro em relação ao diestro.

4. O aumento da participação de adrenocetores- β_2 na resposta às catecolaminas em átrios direitos isolados ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, durante o estro, metaestro e diestro, poderia ser determinado pelo aumento nos níveis de corticosterona e progesterona, acompanhada de uma queda nos níveis de estradiol.

5. A ausência de alterações de sensibilidade adrenérgica no marcapasso isolado de ratas submetidas a três sessões de choques nas patas, aplicadas durante o diestro, proestro e estro, poderia estar relacionada à não variação dos níveis de estradiol em resposta às sessões de choques, e o menor nível de ansiedade antes da aplicação da segunda sessão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANISHCHENKO, T.G. & GUDKOVA, E.V. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenaline. *Byull. Éksp. Biol. Med.*, **113**(6): 577-579, 1992.
- ARMSTRONG, D. T. Environmental stress and ovarian function. *Biol. Reprod.*, **34**: 29-29, 1986.
- AXELROD, J. & REISINE, T. D. Stress Hormones: Their interaction and regulation. *Science*, **224**(4648):452-459, 1984.
- BACKSTROM, T. & CORTENSEN, H. Estrogen and progesterone in plasma in relation to premenstrual tension. *J. Steroid. Biochem.*, **5**: 257-260, 1974.
- BÁNKY, Z.; NAGY,G.M. & HALÁSZ, B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology*, **59**: 63-71, 1994.
- BARON, S. & BRUSH, R. Effects of acute and chronic restraint and oestrus cycle on pituitary-adrenal function in the rat. *Horm. Behav.*, **12**:218-224, 1979 .
- BASSANI, R. A. & DE MORAES, S. Subsensitivity to beta adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock stressed rats. *Gen. Pharmacol.*, **18**:473-477, 1987.
- BASSANI, R. A. & DE MORAES, S. Variações de sensibilidade a catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos submetidos a choque na pata. I Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, São Paulo. *Anais*, p. 299, 1986.
- BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56**: 335-344, 1989.
- BERNE, R. M. & LEVY, M. N. *Fisiologia*. 2ª ed. Guanabara Koogan Ed., Rio de Janeiro, Brasil, 1988.

- BIEGON, A.; McEWEN, B. S. Modulation by estradiol of serotonin₁ receptors in brain. **J. Neurosci.**, **2** (2): 199-205, 1982.
- BIEGON, A.; BERCOVITZ, H.; SAMUEL, D. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. **Brain Res.**, **187**: 221-225, 1980.
- BITRAN, D.; HILVERS, R.J. & KELLOGG, C.K. Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α [β]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA_A receptor. **Brain Res.**, **561**: 157-161, 1991.
- BITRAN, D.; HILVERS, R. J. & KELLOGG, C. K. Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α [β]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA_A receptor. **Brain Res.**, **561**: 157-161, 1991.
- BOEHM, N.; PLAS-ROSER, S.; ROOS, M.; ARON, C. How different procedures of blood removal affect blood progesterone concentration in the cyclic female rat. **J. Steroid. Biochem.**, **16**: 339-342, 1982.
- BRILEY, M.; CHOPIN, P. & MORET, C. Effect of serotonergic lesion on "anxious" behavior measured in the elevated plus-maze test in the rat. **Psychopharmacology**, **101**: 187-189, 1990.
- BROWN-GRANT, K; EXLEY, D. & NAFTOLIN, F. Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat. **J. Endocr.**, **48** (2); 295-296, 1970.
- BRUCE, N.W.; WILLCOX, D.L.; MEYER, G.T. & WADDEL, B.J. Effects of handling, anesthesia, ovariectomy and adrenalectomy on serial measurements of plasma progesterone in 16-day pregnant rats. **J. Endocr.**, **100**: 189-193, 1984.
- BRYAN, L. J.; COLE, J.J.; O'DONNELL, S.R. & WANSTALL, J.C. A study designed to explore the hypothesis that beta₁ adrenoceptors are "innervated" receptors, and beta₂ adrenoceptors are "hormonal" receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **216**: 395-400, 1981.

- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W.E. & FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, **94**: 1704-1708, 1974.
- CALLIA, M. L. **Supersensibilidade de adrenoceptores β_1 cardíacos e níveis plasmáticos de corticosterona em ratos expostos ao frio.** São Paulo. Dissertação de mestrado. Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. 62pp., 1981.
- CALLIA, M. L. & DE MORAES, S. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **230**: 450-454, 1984.
- CANNON, W.B.; QUERIDO, S.; BRITTON, S.W. & BRIGHT, E.M. Studies on the conditions of activity in endocrine glands. The role of adrenal excretion in the chemical control of body temperature. **Am. J. Physiol.**, **79**:466-506, 1927.
- CAPAZ, F.R. & DE MORAES, S. Reduction by acute restraint stress of norepinephrine sensitivity in the isolated rat pacemaker. **Eur. J. Pharmacol.**, **147**: 295-298, 1988.
- CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. **JAMA**, **267** (9): 1244-1252, 1992.
- CIOCCA, D. R.; ROIG, L. M. V. Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. **Endoc. Rev.**, **16**(1): 35-62, 1995.
- CONDON, T. P.; RONNEKLEIV, O. K. & KELLY, M. J. Estrogen modulation of the α -1 adrenergic response of hypothalamic neurons. **Neuroendocrinology**, **50**(1):51-58, 1989.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F. & GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **49** (1): 171-176, 1994.
- DAVIES, A. O. & LEFKOWITZ, R. J. Regulation of beta-adrenergic receptors by steroid hormones. **Ann. Rev. Physiol.**, **46**: 119-130, 1984.

- DEIS, R. P.; LEGUIZAMON, E. & JAHN, G.A. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. **J. Endocr.**, **120**: 37-43, 1989.
- DÍAZ-VÉLIZ, G.; SOTO, V.; DUSSAUBAT, N. & MORA, S. Influence of the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. **Physiol. Behav.**, **46**(3): 397-401, 1989.
- DRICKAMER, L. C. Determination of oestrous condition in female mice is dependent upon time of day. **J. Reprod. Fert.**, **79**: 659-662, 1987.
- DUPON, C. & KIM, M. H. Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione, and oestradiol during the rat oestrous cycle. **J. Endocr.**, **59** (3): 653-654, 1973.
- ETGEN, A.M. & PETITTI, N. Norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation in rat hypothalamic slices: effects of estrous cycle and ovarian steroids. **Brain Res.**, **375**: 385-390, 1986.
- EUKER, J.S.; MEITES, J. & RIEGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. **Endocrinology**, **96**: 85-92, 1975.
- FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D.M. & SPADARI-BRATFISCH, R.C. Efeito do estresse sobre a sensibilidade da resposta lipolítica às catecolaminas. XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu - MG, **Anais.**, p. 274. 1998.
- FRANKS, B.D. What is stress? **QUEST**, **46**: 1-7, 1994.
- FREEMAN, M. E. **The ovarian cycle of the rat**. In: The Physiology of Reproduction. E. Knobil & J. Neil (Ed.) Raven Press, LTD. New York, 1988.
- FREGLY, M.; THRASHER, T.N.; MACARTHUR, S.A. & KELLEHER, D.L. Attenuation of a β -adrenergic response in rats treated chronically with ethynyl estradiol. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **157**: 18-22, 1978.

- FRIEDMAN, B.H. & THAYER, J.F. Anxiety and autonomic flexibility: a cardiovascular approach. **Biol. Psychol.**, 47 (3): 243-263, 1998.
- GARCIA-MARQUEZ, C.G. & ARMARIO, A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. **Physiol. Behav.**, 40: 33-38, 1987.
- GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 20: 263-312, 1989.
- HARRI, M. N. E.; MELENDER, L. & TIRRI, R. Changed chronotropic sensitivity to sympathomimetic amines in isolated atria from rats following cold acclimation. **Experientia**, 30:1041-1043, 1974.
- HASHIMOTO, I; HENRICKS, D.M.; ANDERSON, L. L. & MELAMPY, R. M. Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. **Endocrinology**, 82: 333-341, 1968.
- HATJIS, C. G.; DONALD, R. K. & CREWS, A. Up-regulation of guinea pig myometrial β -adrenoceptors by systemic estradiol and progesterone. **Endocrinology**, 122: 1455-1459, 1988.
- HENNESSY, M.B.; HEYBACH, J.P.; VERNIKOS, J. & LEVINE, S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. **Physiol. Behav.**, 22: 821-825, 1979.
- HERD, J.A. Cardiovascular response to stress. **Physiol. Rev.**, 71 (1): 305-330, 1991.
- HOAR, W.S. **General and Comparative Physiology**. 2nd ed. Prentice-Hall International, ed. New Jersey EUA, 1975.
- HOFFMAN, H.S. & FLESHLER, M. A relay sequencing device for scrambling grid shock. **J. Exp. Anim. Behav.**, 55: 329-330, 1962.
- HOKFELT, T.; FAHRENKRUG, J.; TATEMOTO, K.; MUTT, V.; WERNER, S.; HULTING, A. L.; TRERENIUS, L. & CHANG, K. J. The PHI (PHI-

- 27)/corticotrophin releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:895-898, 1983.
- HOLZBAUER, M. & YODIM, M.B.H. The oestrous cycle and monoamine oxidase activity. *Br. J. Pharmac.*, **48** : 600-608, 1973.
- HOUSSAY, B. *Fisiologia Humana*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil, 1980.
- IWAMOTO, M. & MARCONDES, F.K. Influência do sexo sobre o tempo de imobilidade de ratos submetidos à natação em espaço amplo. XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu - MG, *Anais.*, p. 344. 1998.
- JENNINGS, W. A. Total home-cage activity as a function of the estrous cycle and wheel running in the rat. *Psychon. Sci.*, **22**(3): 164-165, 1971.
- KANO, T. Effects of estrogen and progesterone on adrenoceptors and cyclic nucleotides in rat uterus. *Japan. J. Pharmacol.*, **32**: 535-549, 1982.
- KANT, G. J.; OUGUY, E. H.; PENNINGTON, L. L. & MEYERHOFF, J. L. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH, corticosterone and prolactin. *Life Sci.*, **33**:2657-2663, 1983.
- KIMURA, F.; MASAZUMI, K.; NAKANO, H. & McCANN, S.M. Changes in adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5' -monophosphate concentrations in the anterior pituitary and hypothalamus during the rat estrous cycle and effects of administration of sodium pentobarbital in proestrus. *Endocrinology*, **106** (2): 631-635, 1980.
- KLANKALYA, B. & CHAN, A. The effects of ovarian hormones on beta-adrenergic and muscarinic receptors in rat heart. *Life Sci.*, **42**(23):2307-2314, 1988.

- KONDO, K.; OKUNO, T.; EGUCHI, T.; YASUI, T.; SUZUKI, H.; NAGAHAMA, S. & SARUTA, T. Vascular action of high dose estrogen in rats. **Endocrinol. Japon.**, 27 (3): 307-313, 1980.
- KRALL, J.F.; MORI, H.; TUCK, M.L.; LeSHON, S.L. & KORENMAN, S.G. Demonstration of adrenergic catecholamine receptors in rat myometrium and their regulation by sex steroid hormones. **Life Sci.**, 23 (10): 1073-1082, 1978.
- KRULICH, L.; HEFCO, E.; ILLNER, P. & READ, C.B. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. **Neuroendocrinology**, 16: 293-311, 1974.
- KUENG, W.; WIRZ-JUSTICE, A.; MENZI, R. & CHAPPUIS-ARNDT, E. Regional brain variation of tryptophan, monoamines, monoamine oxidase activity, plasma free and total tryptophan during the estrous cycle of the rat. **Neuroendocrinology**, 21: 289-296, 1976.
- LAMBERT, J.J.; BELELLI, D.; HILL-VENNING, C. & PETERS, J.A. Neurosteroids and GABA_A receptor function. **TIPS**, 16: 295-303, 1995.
- LESCOAT, G., JEGO, P., BERAUD, B. & MANEY, J. Influence de sexe sur les modalités de réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien aux agressions émotionnelles et somatiques chez le rat. **C. R. Soc. Biol.**, 164:2106-2113, 1970.
- LEVIN, R. M.; SHOFR, F. S. & WEIN, A. J. Estrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 215(3):614-618, 1980.
- LONG, J.A. & EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Mem. Univ. Calif.**, 6: 1-148, 1922.
- MacNIVEN, E.; de CATANZARO, D. & YOUNGLAI, E.V. Chronic stress increases estrogen and other steroids in inseminated rats. **Physiol. Behav.**, 52: 159-162, 1992.
- MAGGI, A.; ZUCCHI, I. & PEREZ, J. Progesterone in brain: modulation of β -adrenergic receptor activity. **Pharmacol. Res. Commun.**, 17 (3): 283-291, 1985.

- MAJEWSKA, M. D.; HARRISON, N. L.; SCHWARTZ, R. D.; BARKER, J. L. & PAUL, S. M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. **Science**, **232**: 1004-1007, 1986.
- MAK, J.C.W.; NISHIKAWA, M. & BARNES, P.J. Glucocortico-steroids increase β_2 -adrenergic receptor transcription in human lung. **Am. J. Physiol.**, **268**: L41-L46, 1995.
- MALAYER, J.R. & GORSKI, J. An integrated model of estrogen receptor action. **Domest. Anim. Endoc.**, **10** (3): 159-177, 1993.
- MALBON, C. C. & HADCOCK, J. R. Evidence that glucocorticoid response elements in the 5'-noncoding region of the hamster β_2 -adrenergic receptor gene are obligate for glucocorticoid regulation of receptor mRNA levels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **145**(2):676-681, 1988.
- MANDL, A. M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **J. Exp. Biol.**, **28**: 576-584, 1941.
- MANO, K.; AKBARZADEH, A. & TOWNLEY, R.G. Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. **Life Sciences**, **25**: 1925-1930, 1979.
- MARCONDES, F. K. Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos. **Tese de Mestrado**. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. p.58, 1995.
- 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.**, **74**: 663-669, 1996.
- MARPLE, D.N.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; BLAKE, W.H. & JUDGE, M.D. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. **J. Anim. Sci.**, **35** (3): 576-579, 1972.
- MARRONE, B.B. Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycles, castration and steroid replacement. **Physiol. Behav.**, **17**: 419-425, 1976.

- MARWITZ, M. & STEMMLER, G. On the status of individual response specificity. **Psychophysiology**, **35** (1): 1-15, 1998.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom. Med.**, **30**: 576-607, 1968a.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom. Med.**, **30**: 631-653, 1968b.
- McCARTHY, M. M.; McDONALD, C. H.; BROOKS, P. J. & GOLDMAN, D. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. **Physiol. Behav.**, **60** (5): 1209-1215, 1996.
- McEWEN, B. S. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. **Trends Pharmacol. Sci.**, **12**: 141-147, 1991
- MEYER, D.C. & QUAY, W. B. Hypothalamic and suprachiasmatic uptake of serotonin *in vitro*: twenty-four-hour changes in male and proestrus female rats. **Endocrinology**, **98**: 1160-1165, 1976.
- MINNEMAN, K. P. & MOLINOFF, P. B. Classification and quantification of beta adrenergic receptor interactions: I. Determination of the properties of receptors subtypes. **Life Sci.**, **29**: 427-443, 1980.
- MOAWAD, A.H.; RIVER, L.P. & KILPATRICK, S.J. The effect of estrogen and progesterone on β -adrenergic receptor activity in rabbit lung tissue. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **144**: 608-613, 1982.
- MORA, S.; DUSSAUBAT, N. & DÍAZ-VÉLIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral index of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, **21** (7): 609-620, 1996.
- NAFTOLIN, F; BROWN-GRANT, K. & CORKER, C.S. Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrous cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. **J. Endocr.**, **53**: 17-30, 1972.

- NATELSON, B. H.; OTTENWELLER, J. E.; COOK, J. A.; PITMAN, D.; McCARTY, R. & TAPP, W. N. Effect of Stressor Intensity on Habituation of the Adrenocortical Stress Response. **Physiol. & Behav.**, **43**:41-46, 1988.
- NEQUIN, L. & SCHWARTZ, N.B. Adrenal participation in the timing of mating and LH release in cyclic rat. **Endocrinology**, **88**: 325-331, 1971.
- NEQUIN, L.G.; ALVAREZ, J. & SCHWARTZ, N. B. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. **Biol. Reprod.**, **20**: 659-670, 1979.
- NEUMANN, I.D.; JOHNSTONE, H.A; HATZINGER, M.; LIEBSCH, G.; SHIPSTON, M.; RUSSELL, J.A.; LANDGRAF, R. & DOUGLAS, A. J. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. **J. Physiol.**, **50** (1): 289-300, 1998.
- NOURANI, F.R.R. SPADARI, R.C. & DE MORAES, S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. **Gen. Pharmac.**, **23** (4): 787-91, 1992.
- OGLE, T.F. & KITAY, J.I. Ovarian and adrenal steroids during pregnancy and the estrous cycle in the rats. **J. Endocr.**, **74**: 89-98, 1977.
- ÖSTMAN-SMITH, I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. **Acta Physiol. Scand.** **477** (Suppl.): 1-118, 1979.
- PARÉ, W.P. & REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. **Physiol. Behav.**, **54**: 1179-1185, 1993.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. & BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **J. Neurosci. Meth.**, **14**: 149-167, 1985.

- PLAS-ROSER, S. & ARON, C. New data concerning the control by the adrenals of sexual receptivity in the rat. **Physiol. Behav.**, **19**: 57-60, 1977.
- PLAS-ROSER, S. & ARON, C. Stress related effects in the control of sexual receptivity and in the secretion of progesterone by the adrenals in cyclic female rats. **Physiol. Behav.**, **27**: 261-264, 1981.
- POLLARD, I.; WHITE, B.; BASSETT, J.R. & CAIRNCROSS, K. D. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrous cycle following unpredictable stress in the rat. **Behav. Biol.**, **14**: 103-108, 1975.
- PUERTA, M.; ABELENDA, M.; NAVA, M.P. & FERNANDEZ, A. Reduced noradrenaline responsiveness of brown adipocytes isolated from estradiol-treated rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **71**: 858-861, 1993.
- RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M. Pharmacology. 3rd ed. Churchill Livingstone, New Jersey, EUA, 1995.
- RIEGLE, G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. **Neuroendocrinology**, **11**: 1-10, 1973.
- ROBERTS, J. M.; GOLDFIEN, R. D.; TSUCHIYA, A. M.; GOLDFIEN, A. & INSEL, P.A. Estrogen treatment decreases α -adrenergic binding sites on rabbit platelets. **Endocrinology**, **104** (2): 722-728, 1979.
- ROBERTS, J. M.; INSEL, P. A. & GOLDFIEN, A. Regulation of myometrial adrenoceptors and adrenergic response by sex steroids. **Mol. Pharmacol.**, **20**: 52-58, 1981.
- ROBERTS, J.M.; INSEL, P.A.; GOLDFIEN, R.D. & GOLDFIEN, A. α -Adrenoceptors but not β -adrenoceptors increase in rabbit uterus with oestrogen. **Nature**, **270**: 624-625, 1977.
- RODRIGUES, M.L.V. Sensibilidade às catecolaminas dos átrios direitos de ratas: influência das fases do ciclo estral e do estresse. Tese de Mestrado. Instituto de

Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 74pp., 1993.

RODRIGUES, M.L.V.; MARCONDES, F.K. & SPADARI-BRATFISCH, R.C. Relationship between sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmac.**, 73: 602-607, 1995.

SANTOS, I.N. **Caracterização da população de adrenoreceptores beta em átrios direitos de ratas controles ou submetidas a estresse.** Tese de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 103pp., 1998.

SCHAEFFER, C. & ARON, C. Stress-related effects on the secretion of progesterone by the adrenals in castrated male rats presented to stimulus males. Involvement of oestrogen. **Acta Endocrinologica**, 114: 440-445, 1987.

SEEMAN, M. V. Psychopathology in women and men: focus on female hormones. **Am. J. Psych.**, 154 (12): 1641-1647, 1997.

SEGGIE, J. & BROWN, G.M. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin and growth hormone in rat, following handling or exposure to novel environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 53: 629-637, 1975.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 138(1):32, 1936.

SHAIKI, A. A. & SHAIKI, S. A. Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. **Endocrinology**, 96: 37-44, 1975.

SLONAKER, J. L. The effect of pubescence, oestruation and menopause on the voluntary activity in the albino rat. **Am. J. Physiol.**, 68: 294-315, 1924.

SMITH, E. R.; BOWERS, C.Y. & DAVIDSON, J.M. Circulating levels of plasma gonadotropins in 4 and 5 day cycling rats. **Endocrinology**, 93: 756-758, 1973.

- SMITH, M.S.; FREMMAN, M.E. & NEILL, J. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, 96:219-226, 1975.
- SPADARI, R. C. **Sensibilidade às catecolaminas no átrio direito isolado de ratos submetidos à natação: o papel da corticosterona**. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia e Biofísica. 58 pp., 1985.
- SPADARI, R. C.; BASSANI, R. A. & DE MORAES, S. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. **Gen. Pharmac.**, 19(1):129-135, 1988.
- SPADARI, R.C. & DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of isolated rat pacemaker to chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. **Gen. Pharmac.**, 19(4):553-557, 1988.
- SPADARI-BRATFISCH, R. C.; SANTOS, I.N.; VANDERLEI, L.C. & MARCONDES, F. K. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, no prelo, 1998.
- STUMPF, W.E. & SAR, M. The heart: a target organ for estradiol. **Science**, 196 (4287): 319-321, 1977.
- TOUCHETTE, N. Man bites dogma: a new role for steroid hormones. **J. NIH Res.**, 2: 71-74, 1990.
- TREIT, D. & FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 31: 959-962, 1989.
- TREIT, D.; MENARD, J. & ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 44: 463-469, 1993.

- VAN DER KAR, L. D.; RICHARDSON-MORTON, K. & RITTENHOUSE, P. A. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. **Methods Achieve Exp Pathol.**, **14**:133-173, 1991.
- VAN GOOZEN, S.H.M.; MATTHYS, M.; COHEN, K.P.T.; GISPEN, C.; WIEGANT, V.M. & VAN ENGELAND, H. Salivary cortisol and cardiovascular activity during stress in oppositional-defiant disorder boys and normal controls. **Biol. Psych.**, **43** (7): 531-539, 1998.
- VANDERLEI, L. C. M.; MARCONDES, F. K.; LANZA, L. L. B. ; 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.**, **74**: 670-678, 1996.
- VANDERLEI, L.C.M. **Influência do ciclo estral e do estresse sobre a sensibilidade às catecolaminas em átrios de ratas.** Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Ciências Fisiológicas.103pp., 1996.
- VIAU, V. & MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, **129**(5):2503-2511, 1991.
- VOGEL, W.H. & JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. **Neurosc. Lett.**, **87**: 183-188, 1988.
- WEILAND, N.G. & WISE, P.M. Diurnal rhythmicity of β_1 -and β_2 -adrenoceptors in ovariectomized, ovariectomized estradiol-treated and proestrus rats. **Neuroendocrinology**, **50**: 655-662, 1989.
- WIDERSTROM, N.E.; DYREHAG, L.E.; BORGLUM, J.L.; ASLUND, P.; WENNEBERG, B. & ANDERSSON, S. A. Pain threshold responses to two different modes of sensory stimulation in patients with orofacial muscular pain: psychologic considerations. **J. Oral Pain**, **12** (1): 27-34, 1998.

- WIELAND, S.; LAN, N. C.; MIRASEDEGHI, S. & GEE, K. W. Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. **Brain. Res.**, **565**: 263-268, 1991.
- YOUNG, W. C.; BOLING, J. L. & BLANDAU, R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. **Anat. Rec.**, **80**: 37-45, 1941.
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 2nd ed. prentice-Hall International, ed. New Jersey EUA, 1984.
- ZOLOVICK, A.J.; PEARSE, R.; BOEHLKE, F.W. & ELEFThERIOU, B.E. Monoamine oxidase activity in various parts of the rat brain during the estrous cycle. **Science**, **154**: 649-650, 1966.
- ZSCHAECK, L.L. & WURTMAN, R. J. Brain ³H-catechol synthesis and the vaginal estrous cycle. **Neuroendocrinology**, **11**: 144-149, 1973.

ABSTRACT

Right atria isolated from female rats submitted to three footshock or swimming sessions showed changes on sensitivity to catecholamines, when the stress sessions were applied during estrus, metestrus and diestrus (Diestrus Group), without changes when they were applied at diestrus, proestrus and estrus (Estrus Group).

The aim of this work was to analyse the seric levels of corticosterone, progesterone and estradiol from rats submitted to the same protocols to evaluate the influence of the estrous cycle on the hormonal responses to footshock and swimming stress, and to verify the relationship between these hormonal responses and the development of changes on the sensitivity to catecholamines in right atria from stressed female rats sacrificed at diestrus, but not at estrus.

We observed an increase of corticosterone and progesterone in the serum from rats submitted to footshock stress, without changes on the levels of estradiol, at both groups Diestrus and Estrus. However, swimming stress induced higher increase in corticosterone levels from rats sacrificed at diestrus than at estrus. In both groups, there were similar increases on progesterone levels. After swimming stress, female rats sacrificed at diestrus didn't show any variation in the seric levels of estradiol. On the other hand, estradiol seric levels increased at Estrus group, without change at Diestrus group.

The time-course of the changes in the seric levels of corticosterone and progesterone were not different between Diestrus and Estrus group, after footshock stress. However the levels of estradiol decreased after the first footshock session in rats from the Diestrus group. In rats from the Estrus group, footshock stress didn't induced any changes in the levels of this hormone, except for an increase in the morning of the second stress session. However, this increase probably was induced by the estrous cycle since the animals were at proestrus phase.

We also analysed the anxiety levels of control female rats. Anxiety levels were lower during proestrus than during diestrus.

We suggest that the increase on corticosterone and progesterone levels with a decrease on estradiol levels could induce the changes on sensitivity to catecholamines in

right atria from female rats submitted to footshock stress and sacrificed at diestrus. On the other hand, these changes are prevented in stressed female rats sacrificed at estrus when the increase on corticosterone and progesterone levels occurred without changes on estradiol levels, and during proestrus, when anxiety levels are lower.