

Josiane Lombardi Verago

**Concentrações Plasmáticas de Corticosterona, Glicose,
Glicerol e Triacilgliceróis em Resposta à Infusão de
Agonistas Beta-Adrenérgicos em Ratos Submetidos a
Estresse por Choque nas Patas.**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

Este exemplar corresponde à redação final
da defesa pelo(a) candidato(a)
Josiane Lombardi Verago
e aprovada pela Comissão Julgadora *R.C.*

18/04/2000

CHAMADA:
 I/ UNICAMP
 V58c
 Ex.
 MBO BC/ 41404
 IOC. 278/00
 C ☐ D ☒
 REÇS. R\$ 11,00
 ATA 07-07-00
 I.º CPD

CM-00142399-1

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V58c Verago, Josiane Lombardi
 Concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilglicerol em resposta à infusão de agonistas beta-adrenérgicos em ratos submetidos a estresse por choque nas patas. - - Campinas, SP:[s.n.], 1999.
 64f.:ilus.

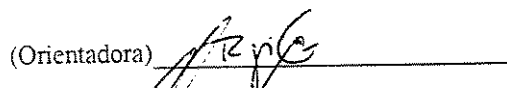
Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Estresse. 2. Metabolismo. 3. Lipólise. I. Spadari-Bratfish, Regina Célia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 18/04/2000

Banca Examinadora:

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



Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva



Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes



Profa. Dra. Marta Helena Krieger



CARTA DE AGRADECIMENTOS

Vocês sabem como é bom lembrar daqueles que nos ajudaram em qualquer trabalho que seja, sobretudo quando se está próximo do resultado final. Portanto, acredito que para reforçar meus agradecimentos, posso fazer deles mais do que uma objetiva lista de nomes. Posso contextualizá-los. Posso também estendê-los àqueles, que se não estavam no laboratório, contribuíam fazendo parte de outras esferas de minha vida neste período de 1997 a 2000.

Não é preciso dizer que agradecimentos, devo eternamente aos meus pais, **Decio e Suzi**, e por muito mais que se poderia mencionar nesta carta.

Entretanto, foi a querida Profa. de Graduação, **Irene** (Unesp de Bauru), quem nos estimulou em direção à pós-graduação, à carreira acadêmica e à pesquisa, a qual agradeço por isso e também pela simplicidade que nos inspirava.

Entre outros professores da Unesp de Bauru, agradecimentos ao Prof. **Júnior**, com quem realizei a iniciação científica em Fisiologia; **Anne e Zé Roberto**, que me auxiliaram nos contatos iniciais com o Departamento de Fisiologia da Unicamp.

À Profa. **Alba** agradeço pela recepção ao Departamento, mas também pela iniciativa na resolução dos problemas decorrentes do processo de mudança de orientador e do projeto de mestrado. À Profa. **Doris**, pela oportunidade inicial de orientação em um de seus projetos de pesquisa.

Finalmente, agradeço àquela que além do crédito de trabalho, muito ofereceu-me em respeito humano e profissional: a Profa. **Regina**, orientadora deste projeto, a qual admiro por sua objetividade. E também à Profa. **Dora**, que além da presença no desenvolvimento prático, didático e teórico do projeto, também foi nossa conselheira.

Às Profas. **Marta e Marie**, pela orientação metodológica e acompanhamento nos experimentos feitos em seu laboratório, e também auxílio na discussão dos resultados.

Aos demais Profs. do Departamento como **Ari, Elenice, Miguel, Helena, Franchesco, Cristina, Liana, Boschero, Everardo**, agradeço pelas contribuições ao desenvolvimento da tese, pela formação didática e profissional. Em especial aos Profs. **Ari, Miguel, Elenice, Liana e Franchesco** pelas oportunidades de conversar e pela cordialidade.

Aos Profs. **Denise** (Depto. Bioquímica), pela utilização de equipamentos em seu laboratório e auxílio na discussão de resultados; **Arício** (Depto. Parasitologia) pela atenção e interesse prestados na orientação das análises estatísticas; **Max Lafontan** (Inserm-França), pelo auxílio na discussão dos resultados.

Às Profas. **Lúcia** (Depto. Bioquímica), **Marta e Fernanda**, que compuseram a banca examinadora, agradeço por toda contribuição, quer em forma de correções, de reflexões e/ou de sugestões.

Agradeço aos funcionários **Ivo, Sônia, André, Davi, Lécio, Viviane, Lurdes, Washington, Machado**, e especialmente à **Zefa, Alexandra, Dona Cida e Luzinete** pela amizade; e também aos funcionários da secretaria de pós-graduação do Instituto de Biologia.

Aos meus queridos amigos de curso, agradecimentos dobrados àqueles que estavam no laboratório, **Elis, Iraídes, Fernanda Klein, Marília, Rita, Valéria, Alexandre, Paula, Gustavo, André e Fernanda** pelos momentos de trabalho em conjunto e de descontração. À **Elis e Ira**, também pela amizade traduzida em paciência e preocupação. Ao **Bruno**, pois curiosamente foi quem mais estimulou e exigiu minha dedicação ao projeto de tese, o qual ele havia iniciado.

Aos demais amigos do Departamento, entre eles **Bia, Ana Cláudia, Luciana, Mércia, Nádia, Helen, Ismael, Maria Esméria, Roberto, Mário, Clélia, Wagner, Brígida, Sandra, Gislaine, Fabrício, Chicão, Jairo, Carol, Walber, Juliano**, e especialmente à **Janaína**, com quem cursei a graduação, e agradeço-a pelo companheirismo durante a adaptação a Campinas e nos períodos em que convivemos.

Aos amigos de Bauru, **Fabiana, Nilza, Domingos, Dona Alaíde, Graziela, Dona Ângela, Sérgio, Shiro, Marono**, à prima **Cristina**, à tia **Leo**, pelo incentivo constante.

Aos amigos de moradia, que hoje são como irmãos, **Filipe, Edy Carlos, Liciane, Edwirges, Marco, Paulo, André, Fernanda e Carol**. Ao **Fabrício**, a quem amo, a despeito das críticas, pelo que pude através dele conhecer.

Para finalizar, agradeço a **todo contribuinte brasileiro**, pela manutenção financeira das Universidades Públicas, e à **CAPES e FAPESP**, pelo financiamento do projeto e da bolsa de pesquisa.

Entretanto, já que os agradecimentos às instituições de fomento se estendem automaticamente ao **Governo Federal**, carecem de uma ressalva de insatisfação, relativa a sua política de desmantelamento da Universidade Pública, que é progressiva. E até então não foi levada a cabo, por ter frequentemente esbarrado em resistências sociais. A estas, devemos não só agradecer, mas delas participar.

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
1. INTRODUÇÃO	03
1.1. Aspectos neuroendócrinos do estresse	
1.2. Efeitos metabólicos dos hormônios do estresse	
1.3. Estresse e sensibilidade das respostas dos tecidos às catecolaminas	
2. RESUMO DOS RESULTADOS	12
2.1. Concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilgliceróis	
2.2. Resposta à infusão de isoproterenol, noradrenalina ou BRL37344	
2.3. Análises complementares: pressão arterial média e frequência cardíaca	
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	33
6. ANEXO	67
7. APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS	69

RESUMO

No estresse observa-se a elevação das concentrações plasmáticas de hormônios tais como as catecolaminas, os glicocorticóides e o glucagon. Estes hormônios determinam alterações em funções metabólicas, entre elas as que ocorrem em tecido adiposo, estimulando a lipólise e inibindo a lipogênese, e em tecido hepático, estimulando a glicogenólise, a gliconeogênese e a síntese de lipoproteínas. Além disso, havíamos previamente observado que o estresse por choque repetido nas patas, induz alterações de sensibilidade na resposta lipolítica a agonistas beta-adrenérgicos em adipócitos brancos isolados de ratos. Neste trabalho, utilizamos ratos alimentados e conscientes, submetidos a três sessões diárias de estresse por choque nas patas, para determinar: 1) as concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilgliceróis; 2) as concentrações plasmáticas de glicose, glicerol e triacilgliceróis mediante a infusão endovenosa dos agonistas beta-adrenérgicos: isoproterenol, noradrenalina ou BRL37344; 3) verificar se as alterações de sensibilidade lipolítica previamente demonstradas *in vitro* se refletem nas concentrações plasmáticas de glicerol, em resposta à infusão dos agonistas beta-adrenérgicos citados acima.

Nossos resultados mostraram que a concentração plasmática basal de corticosterona era elevada em comparação àquela observada em ratos anestesiados, e aumentou significativamente após as sessões de estresse, enquanto que a concentração plasmática de triacilgliceróis se elevou após a primeira sessão e a de glicose aumentou após as segunda e terceira sessões de estresse. As concentrações plasmáticas de glicerol não sofreram alterações significativas, antes ou após as sessões de estresse. Os ratos submetidos a estresse foram mais sensíveis à infusão de isoproterenol e noradrenalina junto com prazosin, mantendo elevadas as concentrações plasmáticas de glicose durante a infusão, e respondendo com elevação das

concentrações plasmáticas de glicerol e de triacilgliceróis. A infusão de BRL37344, causou elevação significativa da concentração plasmática de glicerol em ratos submetidos a estresse. É provável que esta maior sensibilidade de ratos estressados aos agonistas beta-adrenérgicos utilizados esteja relacionada à influência permissiva da corticosterona endógena. Apenas o BRL37344 causou elevação da concentração plasmática de glicerol em ratos estressados, em comparação às suas próprias concentrações basais, provavelmente porque adrenocetores-beta3 parecem não estar envolvidos na síntese hepática de triacilgliceróis, permitindo que o glicerol liberado pela lipólise acumule-se no plasma. Os resultados apresentados sugerem que o glicerol liberado do tecido adiposo, estaria sendo inicialmente utilizado pelas células hepáticas para a síntese de triacilgliceróis, mas que, com a repetição do estresse, a função hepática poderia estar sendo redirecionada para a liberação de glicose, possivelmente utilizando o glicerol como um dos substratos. Entretanto esta hipótese necessita ser testada. Além disso, embora adipócitos isolados sejam subsensíveis à noradrenalina, *in vivo* a resposta à infusão de isoproterenol, noradrenalina e BRL37344 é mais pronunciada em ratos estressados do que em ratos controle.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos neuroendócrinos do estresse

O equilíbrio orgânico pode sofrer variações, diante do efeito de fatores do ambiente interno e/ou externo, denominados agentes estressores. Evolutivamente, os animais adquiriram a capacidade de resposta à presença destes agentes. A função desta resposta ao estresse é manter tal equilíbrio orgânico, através de alterações fisiológicas compensatórias, que permitem inicialmente, resistir ao agente estressor e, posteriormente, adaptar-se à sua presença, quando esta é mantida ou repetida.

Esta resposta, está relacionada ao eixo hipotálamo/hipófise/adrenal e foi denominada “Síndrome Geral de Adaptação” por SELYE em 1936, que a descreveu em três estágios. O primeiro estágio, configura uma “reação de alarme”, representando a resposta inicial do organismo, frente ao agente estressor, e ocorreria quando este organismo não estivesse adaptado ao estímulo recebido. Em seguida, sendo mantido o estímulo, ocorreria a fase de resistência, caracterizada pela ativação de mecanismos adaptativos. Não ocorrendo adaptação, desenvolver-se-ia o estágio de exaustão onde o organismo estaria susceptível a distúrbios (SELYE, 1936; VAN DE KAR, 1991).

Inicialmente a Síndrome Geral da Adaptação foi descrita como uma reação geral e inespecífica (SELYE, 1936). A continuidade dos estudos sobre a resposta ao estresse evidenciou seu caráter específico (MASON, 1968 a; MASON, 1968b; KRULICH *et al.*, 1974; HENNESSY, *et al.*, 1979; HERD, 1991) e a influência de características genéticas (MARPLES *et al.*, 1972), do sexo (LESCOAT *et al.*, 1970; ANISCHENKO & GUDKOVA, 1992; PARÉ & REDEI, 1993), da idade (RIEGLE, 1973) e, principalmente, da percepção

individual do agente como estressor, o que depende das experiências vividas anteriormente e da novidade ou previsibilidade do estímulo (VOGEL & JENSH, 1988; GRIFFIN, 1989).

Na resposta ao estresse, a alteração fisiológica inicial decorre da decodificação da informação sensorial pelo sistema límbico-mesencefálico, em associação com áreas corticais do cérebro, e por transmissão neural emissora de sinais ativadores ou inibidores para o eixo hipotálamo-hipófise (ELIOT, 1992).

Observa-se a ativação dos eixos sistema nervoso simpático-medula adrenal e hipotálamo-hipófise-córtex adrenal, causando respectivamente a elevação das concentrações plasmáticas de catecolaminas e de glicocorticóides (SELYE, 1956; UPRICHARD & KVETNANSKY, 1980; AXELROD & REISINE, 1984; KONARSCA *et al.*, 1989; DE BOER *et al.*, 1989; KONARSKA *et al.*, 1990; DE BOER *et al.*, 1990).

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

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

Do aumento nas concentrações plasmáticas de catecolaminas e de glicocorticóides, decorrem alterações metabólicas no sentido de causar mobilização de substratos energéticos, a

partir dos tecidos de armazenamento, como o hepático e o adiposo, liberando-os para a circulação sanguínea.

Este redirecionamento metabólico disponibiliza maior quantidade de carboidratos e lipídios para a atividade celular e permite ajustes de sistemas como o cardiovascular, o respiratório, o nervoso e o muscular. Tais adaptações contribuem para a manutenção da homeostase em situações de estresse, nas quais podem ser deflagrados comportamentos de luta ou fuga (SELYE, 1936; HERD, 1991).

1.2 Efeitos metabólicos dos hormônios do estresse

Os hormônios liberados por estresse agem sobre tecidos como o adiposo, o hepático e o pancreático, modificando o metabolismo de lipídios e de carboidratos, com efeitos opostos aos da insulina (PITTNER *et al.*, 1985 a, b; BRINDLEY *et al.*, 1988).

Com relação ao metabolismo de carboidratos, as catecolaminas endógenas, principalmente a adrenalina, estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese hepáticas (BODO & BENAGLIA, 1938; HIMMS-HAGEN, 1967; EXTON *et al.*, 1972; HUE *et al.*, 1978; YOREK *et al.*, 1980; KNEER & LARDY, 1983; PILKIS & EL-MAGHRABI, 1988).

Em tecido pancreático estas, através de adrenoceptores alfa, estimulam a liberação de glucagon pelas células alfa das Ilhotas de Langerhans, enquanto inibem a liberação de insulina pelas células beta (PORTE, 1969; PORTE & ROBERTSON, 1973), sendo que os adrenoceptores beta podem estimular a liberação de insulina pelas células beta-pancreáticas (YOSHIDA, 1992; ATEF *et al.*, 1996).

A corticosterona influencia o metabolismo de carboidratos através de sua ação permissiva aos efeitos glicogenolíticos e gliconeogênicos das catecolaminas e do glucagon (EXTON *et al.*, 1972).

Como resultado destes efeitos das catecolaminas e dos glicocorticóides, ocorre aumento da glicemia.

Em tecido adiposo branco de ratos, o glucagon e os agonistas beta-adrenérgicos estimulam a atividade lipolítica causando liberação de ácidos graxos livres e de glicerol para o plasma (SLAVIN *et al.*, 1994; LAFONTAN *et al.*, 1995), enquanto os glicocorticóides desempenham um papel permissivo na manutenção da resposta lipolítica às catecolaminas (FAIN & GARCÍA-SÁINZ, 1983).

Aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e de glicerol foram observados em cães e humanos após infusão endovenosa de catecolaminas (HAVER & GOLDFIEN, 1959; CONNOLLY *et al.*, 1991). GALITZKY *et al.* (1993) observaram a elevação de ácidos graxos livres em plasma de cães, durante a infusão de noradrenalina, adrenalina, isoproterenol, BRL37344 e outros agonistas beta-adrenérgicos. DARIMONT *et al.* (1996) demonstraram *in situ*, maior liberação de glicerol pelo tecido adiposo de ratos, após infusão de isoproterenol.

O fígado é considerado o principal tecido responsável pela captação de glicerol plasmático (LIN, 1977), que pode ser utilizado como um dos substratos para a gliconeogênese mas também para a síntese de triacilgliceróis (PITTNER *et al.*, 1985; BRINDLEY *et al.*, 1988; SOUZA *et al.*, 1996).

A síntese hepática de triacilgliceróis a partir de ácidos graxos e de glicerol pode ser modulada pelas catecolaminas, pelo glucagon e pelos próprios ácidos graxos, principalmente através da estimulação da atividade enzimática da fosfatidato fosfohidrolase (PAULETTO *et al.*, 1971; PITTNER *et al.*, 1985 a, b; BRINDLEY *et al.*, 1988). Tanto a síntese, quanto a

atividade desta enzima em hepatócitos, são estimuladas por glicocorticóides (KNOX *et al.*, 1979; PITTNER *et al.*, 1985 a, b; BRINDLEY *et al.*, 1988).

Os triacilgliceróis em células hepáticas podem ser incorporados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e assim serem liberados para o plasma sanguíneo (PITTNER *et al.*, 1985 a, b; TITOV & PITSIN, 1985; BRINDLEY *et al.*, 1988). Entretanto, a velocidade desta liberação é dependente da função circulatória no tecido hepático, e esta também pode ser influenciada pela ação adrenérgica sobre os vasos sanguíneos (GARDEMANN *et al.*, 1991; YAMAUCHI *et al.*, 1998). Em cultura de hepatócitos de ratos, observou-se que a dexametasona estimula a secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (MANGIAPANE & BRINDLEY, 1986).

Além disso, a concentração plasmática de triacilgliceróis também é dependente da velocidade de sua captação, mediada pela atividade da lipoproteína lipase, em tecidos como o adiposo, o muscular e o cardíaco. Vários hormônios influenciam a atividade da lipoproteína lipase, incluindo a insulina, as catecolaminas, e os glicocorticóides. Cada um destes hormônios pode estimular ou inibir sua atividade, o que é variável de acordo com o tecido em que agem (ASHBY & ROBINSON, 1980; HULSMANN & DUBELAAR, 1986; DESHAIES *et al.*, 1993).

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

1.3 Estresse e sensibilidade das respostas dos tecidos às catecolaminas

Como consequência das modificações de natureza neural e hormonal ligadas à reação de estresse, além das modificações na dinâmica metabólica descritas acima, podem ocorrer também alterações da sensibilidade adrenérgica em diferentes tecidos.

Dentre os fatores que determinam subsensibilidade ou supersensibilidade adrenérgica em um dado tecido, considera-se: a ação dos sistemas de metabolização, que limitam a meia vida do agonista na biofase; o número de receptores; a afinidade dos receptores aos agonistas e/ou o processo de acoplamento entre os receptores e os sistemas de segundos mensageiros.

Os mecanismos envolvidos nessas alterações podem variar de acordo com o tipo de agente estressor empregado e de fatores intrínsecos, como a espécie e o sexo do animal. No caso de ratas fêmeas, também dependem das fases do ciclo estral (POLLARD *et al.*, 1975; RODRIGUES *et al.*, 1995; MARCONDES *et al.*, 1996; VANDERLEI *et al.*, 1996; SPADARI-BRATFISCH *et al.*, 1999).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a sensibilidade a agonistas adrenérgicos do tecido cardíaco e, mais recentemente, também de adipócitos isolados de ratos submetidos a estresse (MARCONDES *et al.*, 1996; VANDERLEI *et al.*, 1996; SPADARI-BRATFISCH *et al.*, 1999; FARIAS-SILVA *et al.*, 1999).

Como resultante dos mecanismos adaptativos associados à reação de estresse, os autores demonstraram que ocorre subsensibilidade ou supersensibilidade às catecolaminas em átrios direitos isolados de ratos machos submetidos a diferentes agentes estressores (CALLIA & DE MORAES, 1984; BASSANI & DE MORAES, 1987a,b; BASSANI & DE MORAES, 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988; SPADARI *et al.*, 1988; CAPAZ & DE MORAES, 1988).

Neste mesmo tecido, 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.*, 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988).

Em fêmeas, tanto MARCONDES (1995), utilizando estresse por natação, quanto VANDERLEI *et al.* (1996), que utilizou estresse por choque nas patas, observaram que após três sessões de estresse, quando as ratas eram sacrificadas em diestro, o tecido atrial apresentou subsensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina e da adrenalina. Contudo, quando o sacrifício ocorreu em estro, não foram observadas alterações de sensibilidade do tecido atrial às catecolaminas. Os autores concluíram que as alterações de sensibilidade do tecido atrial, observadas em ratas submetidas a estresse por natação ou choque nas patas, são dependentes das fases do ciclo estral, além de confirmarem que tais alterações ocorrem na vigência de níveis plasmáticos elevados de corticosterona (MARCONDES, 1995; VANDERLEI *et al.*, 1996).

Vários outros autores também relatam alterações de sensibilidade adrenérgica em tecido cardíaco isolado de animais submetidos a estresse por frio, restrição alimentar, exercício físico, imobilização, natação ou choque nas patas (U'PRICHARD & KVETNANSKY, 1980; NOMURA *et al.*, 1981; BASSANI & DE MORAES, 1987 a,b; SPADARI & DE MORAES, 1988).

Com o prosseguimento dos trabalhos, e a compreensão de que o estresse determina alterações de sensibilidade adrenérgica em tecido cardíaco, as quais estão relacionadas com a

resposta hormonal ao agente estressor, surgiu interesse em avaliar se alterações semelhantes ocorreriam em outros tecidos que, reconhecidamente, sejam alvo para a ação das catecolaminas.

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

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

Entretanto, restava demonstrar se as alterações de sensibilidade observadas *in vitro* poderiam também ser observadas *in vivo*. Assim sendo, este foi nosso objetivo neste trabalho. Mais precisamente, utilizamos ratos machos, alimentados e conscientes, após terem sido submetidos a três sessões diárias de estresse por choque nas patas, objetivando a aplicação de dois protocolos experimentais. No primeiro, os animais seriam submetidos inicialmente à cateterização arterial, necessária ao procedimento de coleta de sangue, o qual seria empregado para a obtenção de amostras imediatamente antes e após cada sessão de choque ou procedimento controle. A partir destas amostras determinar-se-iam as concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilgliceróis. No segundo protocolo, os animais seriam submetidos à cateterização venosa (para infusão dos agonistas beta-

adrenérgicos isoproterenol, noradrenalina e BRL37344) e arterial (para coleta de amostras de sangue simultaneamente à infusão). De tais amostras seriam determinadas as concentrações plasmáticas de glicose, glicerol e triacilgliceróis em resposta à infusão destes compostos.

Os resultados referentes ao glicerol obtidos neste segundo protocolo, seriam utilizadas para verificar se as alterações de sensibilidade adrenérgica anteriormente observadas em adipócitos *in vitro*, se refletiriam nas concentrações plasmáticas deste metabólito, mediante a infusão dos agonistas beta-adrenérgicos citados acima.

2. RESUMO DOS RESULTADOS

2.1 Concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, glicerol e triacilgliceróis

A abordagem experimental proposta significou uma inovação em nosso laboratório, implicando em uma relativa dificuldade inicial. A implantação dos catéteres intravasculares e a sua manutenção por vários dias, exigiu o desenvolvimento de habilidades novas, até que os protocolos experimentais pudessem ser realizados com precisão. O manuseio dos animais conscientes também representou outra dificuldade, exacerbada pelo estresse ao qual eles eram submetidos. Os detalhes técnicos destes procedimentos estão descritos na secção “Material and Methods” do trabalho submetido à publicação. Superadas estas dificuldades, os resultados que surgiram são resumidos a seguir:

Em ratos submetidos a estresse por choque nas patas por 3 dias consecutivos, observou-se que:

- as concentrações plasmáticas de corticosterona aumentam significativamente após cada sessão, quando se comparam os grupos estresse e controle por meio do teste-*t* de Student, ou apenas após a 3ª sessão (ANOVA para medidas repetidas),
- as concentrações plasmáticas de glicerol não se alteram,
- as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis aumentam apenas após a 1ª sessão, e
- as concentrações plasmáticas de glicose aumentam após a 2ª e 3ª sessões.

A ausência de alterações na concentração plasmática de glicerol apesar dos níveis elevados de corticosterona e, provavelmente, de catecolaminas endógenas que se segue ao estresse, foi curiosa pois, aceita-se que nestas condições, a lipólise está aumentada e que, como consequência, a liberação de glicerol estaria elevada. Assim, estes dados sugerem que

poderia haver um aumento do *turnover* de glicerol em ratos submetidos a estresse. Por outro lado, como as concentrações de triacilgliceróis aumentaram após a 1ª sessão e as de glicose, após a 2ª e 3ª sessões, poder-se-ia sugerir que após a 1ª sessão de choques, o glicerol liberado estaria sendo utilizado para a síntese de triacilgliceróis pelas células hepáticas, mas que, com a repetição do estresse, a função hepática poderia estar sendo redirecionada para a liberação de glicose. Esta hipótese, entretanto, não foi testada.

2.2 Resposta à infusão de isoproterenol, noradrenalina ou BRL37344

Na segunda etapa do trabalho, ratos controle assim como ratos submetidos a três sessões de estresse por choque nas patas, foram submetidos à infusão endovenosa dos agonistas beta-adrenérgicos isoproterenol, noradrenalina ou BRL37344. Foram coletadas amostras de sangue dos animais 15 min antes do início da infusão, simultaneamente a ela nos tempos 0, 5, 15, 30 min e após seu término aos 45 e 60 min. Utilizando-se o plasma isolado a partir destas amostras, determinaram-se as concentrações plasmáticas de glicose, glicerol e triacilgliceróis. Os resultados obtidos seguem abaixo:

Ratos submetidos a estresse foram mais sensíveis do que ratos controle:

- à infusão de isoproterenol, que causou nos animais estressados, maior elevação da concentração plasmática de triacilgliceróis, do que em ratos controle;
- à infusão de noradrenalina simultaneamente com prazosin, mantendo elevadas as já altas concentrações de glicose durante e após o período de infusão, e aumentando as concentrações plasmáticas de glicerol em ratos estressados mas não em ratos controle, além de causar nos animais estressados, elevação nas concentrações de triacilgliceróis;

- à infusão de BRL37344, que resultou em aumento significativo da concentração plasmática de glicerol, em ratos estressados mas não nos controle.

Tanto a infusão de isoproterenol, quanto a de BRL37344, não causou aumento da glicemia provavelmente devido a seus efeitos em estimular a liberação de insulina pelo pâncreas (POTTER & ELLIS, 1975; POGÁTSA *et al.*, 1978; WOODSON & POTTER, 1979; JOHN *et al.*, 1990; YOSHIDA, 1992; ATEF *et al.*, 1996). Ao passo que a administração de prazosin aos animais, imediatamente após a 3ª sessão de estresse, impediu que a glicemia retornasse ao normal e esta se manteve elevada, durante e após a infusão de noradrenalina, quando esta foi realizada juntamente com este antagonista de adrenoreceptores alfa-1.

Sabe-se que adrenoreceptores alfa-1 estão presentes nos vasos sanguíneos, onde medeiam a vasoconstrição em resposta à noradrenalina (GUIMARÃES, 1986), e além disso, estes adrenoreceptores nas células hepáticas estimulam a glicogenólise (POGÁTSA *et al.*, 1978; JOHN *et al.*, 1990). O bloqueio destes receptores evidencia o efeito beta-adrenérgico da noradrenalina no tecido adiposo estimulando a lipólise (LAFONTAN & BERLAN, 1993; BOUSQUET-MÉLOU *et al.*, 1994; LAFONTAN *et al.*, 1995), e no fígado estimulando a glicogenólise (EXTON *et al.*, 1972; PILKIS & EL-MAGHRABI, 1988). Estes efeitos somados, provavelmente são os responsáveis pela manutenção de elevada glicemia e dos aumentos nos níveis plasmáticos de glicerol e triacilgliceróis em ratos estressados, mas não em animais controle. Estes resultados sugerem que após estresse, a resposta à noradrenalina mediada por adrenoreceptores beta-1, está mais sensível.

Por outro lado, BRL37344 causou aumento na concentração plasmática de glicerol em ratos estressados, em comparação à sua própria concentração basal, e sabe-se que os adrenoreceptores beta-3, não medeiam o efeito das catecolaminas sobre a síntese hepática de triacilgliceróis (EVANS *et al.*, 1996). Desta forma, o glicerol liberado pelo tecido adiposo em resposta ao BRL37344, não sendo utilizado, se acumularia no compartimento plasmático.

A ação permissiva da corticosterona sobre os efeitos das catecolaminas, cuja concentração plasmática está elevada em consequência do estresse, poderia explicar a resposta aumentada à noradrenalina e ao BRL37344, mesmo na vigência da subsensibilidade que ocorre nos tecidos isolados. Esta maior sensibilidade aos efeitos beta-adrenérgicos da noradrenalina e do BRL37344, contraria os resultados obtidos em adipócitos isolados de ratos submetidos ao mesmo agente estressor, os quais apresentaram subsensibilidade aos efeitos destes agentes lipolíticos. Entretanto, *in vivo*, outros fatores interferem com a resposta adrenérgica dos múltiplos tecidos envolvidos.

2.3 Análises complementares: pressão arterial média e frequência cardíaca

Considerando que agonistas beta-adrenérgicos têm importantes efeitos cardiovasculares, os quais poderiam mascarar os efeitos metabólicos que analisamos, avaliamos também o efeito da infusão destes compostos sobre a frequência cardíaca e a pressão arterial média (PAM) de um rato controle. Nestes experimentos que foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Marta Helena Krieger, contamos com sua orientação e também da Profa. Dra. Marie Sumitame.

Como resultados observamos que:

A infusão de solução salina não causou alteração significativa da frequência cardíaca (Figura 1) ou da PAM (Figura 2).

Aos 5 min da infusão de isoproterenol, houve aumento da frequência, que se manteve alta até 15 min após o término da infusão (tempo 45 min), mas a PAM se manteve inalterada.

Aos 5 min de infusão de noradrenalina, houve queda da frequência e aumento da PAM. A frequência em seguida sofreu aumento, com seu ponto máximo ocorrendo aos 30

min de infusão, e nos 30 min seguintes apresentou uma tendência de retorno ao basal. A PAM se manteve elevada durante os 30 min de infusão e 15 min após o final da infusão, já havia retornado ao valor basal.

A administração prévia de prazosin e a sua infusão juntamente com a noradrenalina, não causou alterações significativas da frequência cardíaca, e impediu o aumento da PAM, que seria causado pelo efeito vasoconstictor da noradrenalina mediado por alfa-adrenoceptores vasculares.

A infusão de BRL37344 não causou alterações significativas da frequência cardíaca, mas causou redução tardia da PAM, entre 15 e 30 min após o final da infusão.

O isoproterenol, sendo um agonista de adrenoceptores beta que não discrimina entre os subtipos beta-1, beta-2, beta-3 e provavelmente beta-4, causa aumento da frequência cardíaca por ativação dos adrenoceptores beta-1, predominantes em tecido cardíaco de ratos (KAUMANN, 1997); causa também vasodilatação por meio de sua interação com adrenoceptores beta-2 vasculares. Estes dois efeitos resultam em aumento da frequência cardíaca e manutenção da pressão arterial média. Assim sendo, os resultados da infusão de isoproterenol estão de acordo com o esperado e confirmam que a dose utilizada foi efetiva para promover seus efeitos cardiovasculares.

Por outro lado, o efeito inicial da noradrenalina foi um aumento da pressão arterial média. Este aumento, provavelmente se deve a uma elevação da resistência vascular periférica, que ocorre como consequência da vasoconstrição causada pela interação da noradrenalina com os adrenoceptores alfa vasculares. O aumento da pressão arterial média ativaria o reflexo barocepor, o qual seria responsável pela queda na frequência cardíaca.

Observados nos 5 primeiros minutos de infusão, os efeitos cardíacos da noradrenalina mediados por adrenoceptores beta, resultam em aumento da frequência cardíaca e consequente manutenção de elevada pressão arterial média.

Estes resultados demonstram que a dose de noradrenalina teve os efeitos cardiovasculares esperados e que, portanto, a ausência de aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, glicerol e triacilgliceróis em resposta à infusão de noradrenalina (Figura 4 do manuscrito), foram provavelmente, consequentes da vasoconstrição induzida por este composto nos tecidos periféricos produtores destes metabólitos.

A administração de prazosin aos animais, antes do início da infusão de noradrenalina, confirmou esta hipótese, uma vez que o bloqueio dos adrenoreceptores alfa-1 pelo prazosin, impediu que a noradrenalina causasse aumento da pressão arterial média. Neste caso, os efeitos cardíacos da noradrenalina também não foram observados, mas os efeitos metabólicos se tornaram evidentes (Figura 5).

Os resultados da infusão de BRL37344 sobre a frequência cardíaca e a PAM, coincidiram com os resultados obtidos em resposta a infusão de BRL37344 em cães (TAVERNIER *et al.*, 1992; SHEN *et al.*, 1994).

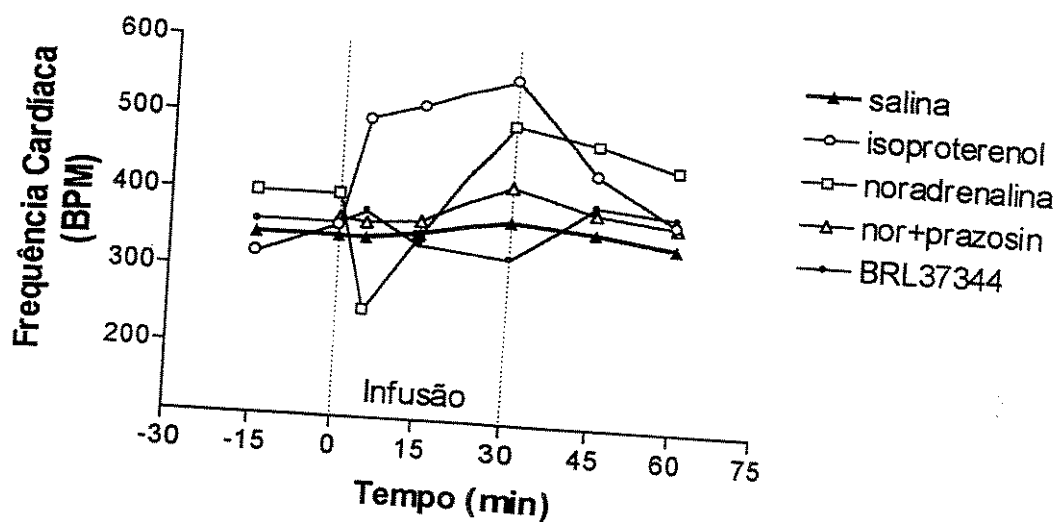


Figura 1: Efeito da infusão i.v. de solução salina (NaCl 0.09% m/v), isoproterenol (0.4nmol/Kg.min), noradrenalina (5.0ug/Kg.min), noradrenalina (5.0ug/Kg.min) e prazosin (8.3ug/Kg.min) ou BRL37344 (0.4nmol/Kg.min), em rato consciente e alimentado sobre a **frequência cardíaca**, após 3 sessões diárias de permanência em gaiola de choques desligada durante 30 minutos (procedimento controle). O animal designado a receber a infusão de noradrenalina junto com prazosin, imediatamente após a terceira sessão de procedimento controle, recebeu 0.2 mg/Kg de prazosin i.p. e trinta minutos após esta injeção, iniciou-se a infusão.

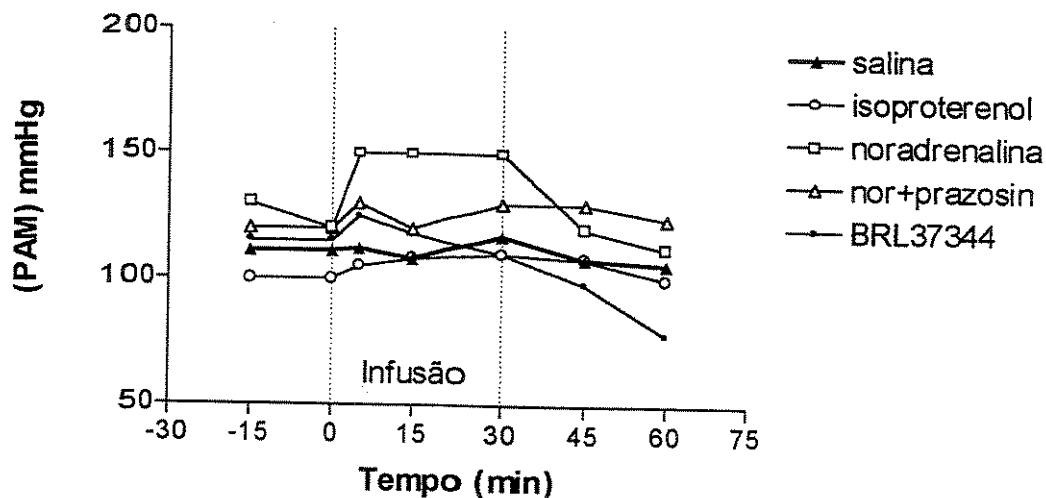


Figura 2: Efeito da infusão i.v. de solução salina (NaCl 0.09% m/v), isoproterenol (0.4nmol/Kg.min), noradrenalina (5.0ug/Kg.min), noradrenalina (5.0ug/Kg.min) e prazosin (8.3ug/Kg.min) ou BRL37344 (0.4nmol/Kg.min), em rato consciente e alimentado sobre a **pressão arterial média (PAM)**, após 3 sessões diárias de permanência em gaiola de choques desligada durante 30 minutos (procedimento controle). O animal designado a receber a infusão de noradrenalina junto com prazosin, imediatamente após a terceira sessão de procedimento controle, recebeu 0.2 mg/Kg de prazosin i.p. e trinta minutos após esta injeção, iniciou-se a infusão.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossos resultados permitem concluir que em ratos submetidos a estresse, por choque nas patas, a resposta hormonal (corticosterona) e metabólica (glicemia), apresenta sensibilização com a repetição da situação aversiva. A concentração plasmática de glicerol não pode ser utilizada como indicadora da atividade lipolítica, uma vez que não se altera após estresse. A concentração plasmática de triacilgliceróis somente se eleva após a 1ª sessão de estresse.

Nossos resultados também permitem concluir que após três sessões de choques nas patas, ratos são mais sensíveis aos efeitos metabólicos do isoproterenol, da noradrenalina e do BRL37344.

Esta aumentada sensibilidade sugere que a resposta de outros órgãos, tais como o pâncreas e o fígado possa estar também alterada pelo estresse e abre perspectiva futura para novas investigações neste sentido. Além disso, os dados obtidos conferem ao modelo experimental utilizado, validade para o estudo do estresse sob os pontos de vista fisiológico e fisiopatológico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DAMLUJI, S. Adrenergic mechanisms in the control of corticotrophin secretion. **J. Endocr.**, v.119, p. 5-14, 1988.
- ANISHCHENKO, T.G. & GUDKOVA, E.V. Sex differences in sensitivity of albino rats to adrenalin. **Bull Exp. Biol. Med.**, v. 113, n.6, p. 769-771, 1992.
- ARMARIO, A.; CASTELLANOS, J.M.; BALASCH, J. Adaptation of anterior pituitary hormones to chronic noise stress in rats. **Behav. Neural Biol.**, v.41, p.71-76, 1984.
- ASHBY, P. & ROBINSON, D.S. Effects of insulin, glucocorticoids, and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipase. **Biochem. J.**, v. 188, p.185-192, 1980.
- ATEF, N.; LAFONTAN, M.; DOUBLE, A.; HELARY, C.; KTORZA, A. & PENICAUD, I. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.298(3), p.287-92, 1996.
- AXELROD, J. & REISINE, T.D. Stress Hormones: Their interaction and regulation. **Science**, v. 24(4648), p. 452-459, 1984.
- BASSANI, R.A. & DE MORAES, S. Subsensitivity to beta-adrenoceptor agonists in right atria isolated from footshock-stressed rats. **Gen. Pharmac.**, v.18, n.5, p.473-477, 1987a.
- _____. Effects of footshock stress on the sensitivity of the isolated rat pacemaker to catecholamines. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v.20, n. 3/4, p.467-470, 1987b.
- _____. Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.246, p. 316-321, 1988.
- BASSET, J.R.; CAIRNCROSS, K.D.; KING, M.G. Parameters of novelty, shock predictability and response contingency in corticosterone release in the rat. **Physiol. Behav.**, v.10, p.901-907, 1973.

- BODO, R.C. & BENAGLIA, A.E. Effect of sympathin on blood sugar. **Am. J. Physiol.** , v.121, p.728-737, 1938.
- BORREL, J.; TORRELAS, A.; GUAZA, C. & BORREL, S. Sound stimulation and its effects on the pituitary-adrenocortical function and brain catecholamines in rats. **Neuroendocrinology**, v. 31, p.53-59, 1980.
- BOUSQUET-MÉLOU, A., GALITZKY, J., CARPÉNÉ, C., LAFONTAM, M. & BERLAN, M. β -Adrenergic control of lipolysis in primate white fat cells: a comparative study with nonprimate mammals. **Am. J. Physiol.** , v.267, p.R115-R-123, 1994.
- BRINDLEY, D.N.; AKESTER, H.; DERRICK, G.P.; IRVINE, C.D.; PATMORE, R.D.; SPENCER, H.; YULE-SMITH, A.; FINNERTY, C.; SAXTON, J.; MACDONALD, I.A. & ROLLAND, Y. Effects of chronic administration of benfluorex to rats on the metabolism of corticosterone, glucose, triacylglycerols, glycerol and fatty acid. **Biochem. Pharmacol.** , v.37(4), p.695-705, 1988.
- BROWN, M.R. & FISHER, L.A. Brain peptide regulation of adrenal epinephrine secretion. **Am. J. Physiol.**, v.10, p. E41-E46, 1984.
- _____ & FISHER, L.A. Corticotrophin-releasing factor: Effects on the autonomic nervous system and visceral systems. **Fed. Proc.** v.44, p.234-248, 1985.
- CALLIA, M.L. & DE MORAES, S. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.230, p. 450-454, 1984.
- CAPAZ, F.R. & DE MORAES, S. Reduction by acute restraint stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v.147, p. 295-298, 1988.
- CHAOULOFF, F.; LAUDE, D.; MERINO, D.; SERRURIER, B. & ELGHOZI, J.L. Peripheral and central consequences of immobilization stress in genetically obese Zucker rats. **Am. J. Physiol.**, v. 256 (2/2), p.R435-42, 1989.

- DE BOER, S.F.; KOOPMANS, S.J.; SLANGER, J.L. & VAN DER GUGTEN, J. Effects of fasting on plasma catecholamine, corticosterone and glucose concentrations under basal and stress conditions in individual rats. **Physiol. & Behav.**, v.45, p.989-994, 1989.
- _____. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats : effect of interstressor interval length. **Physiol. & Behav.**, v. 47, n. 6, p. 1117-1124, 1990.
- DESHAIES, Y; GÉLOEN, A; PAULIN, A.; MARETTE, A. & BUKOWIECKI, L.J. Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. **Horm. Metab. Res.**, v.25, p.13-16, 1993.
- DOBRAKOVOVA, M. & JURICOVICOVA, J. Corticosterone and prolactin responses to repeated handling and transfer of male rats. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.83, p.21-27, 1984
- EVANS, B.A.; PAPAIOANNOU, M.; BONAZZI, V.R. & SUMMERS, R.J. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117(1), p.210-6, 1996.
- ELIOT, R.S. Fisiologia do estresse. *In: Estresse e o coração – mecanismos, avaliação e cuidados.* Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 1992. cap.4, p.23-30.
- EXTON, J.H.; FRIEDMAN, N.; HEE-AIK HONG, E.; BRINEAUX, P.; CORBIN, J.D. & PARK, C.R. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine at the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. **The J. Biol. Chem.**, v. 247(11), p.3579-3588, 1972.
- EUKER, J.S.; MEITES, J. & RIEGLE, G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. **Endocrinology**, v.96, n.1, p.85-92, 1975.
- FAIN, J.N. & GARCÍA-SÁINZ, J.A. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. **J. Lipid Res.**, v.24, p.945-966, 1983.

- FAINTRENIE, G. & GELOEN, A. Alpha-1 adrenergic stimulation of glucose uptake in rat white adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.286(2), p.607-10, 1998.
- FARIAS-SILVA, E.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; WOLF-NUNES, V. & SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced alteration in the lipolytic response to beta-adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. **J. Lipid Res.**, v.40, p.1719-1727, 1999.
- FILE, S.E. The rat corticosterone response: Habituation and modification by chlordiazepoxide. **Physiol Behav.**, v.28, p.259-263, 1982.
- GALITZKY, J.; REVERTE, M.; CARPENÉ, C.; LAFONTAN, M. & BERLAN, M. Beta 3-adrenoceptors in dog adipose tissue: Studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266(1), p.358-366, 1993.
- GARDEMANN, A., JAHNS, U. & JUNGGERMANN, K. Control of glycogenolysis and blood flow by arterial and portal norepinephrine in perfused liver. **Am. J. Physiol.**, v. 260(5/1), p.E762-71, 1991.
- GRIFFIN, J.F.T. Stress and immunity: a unifying concept. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.20, p. 263-312, 1989.
- GUIMARÃES, S. Postsynaptic alpha-adrenoceptors in blood vessels: discrepancies between results obtained *in vivo* and *in vitro*. **In: New aspects of the role of adrenoceptors in the cardiovascular system.** Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Munich, 143pp.,1986.
- HENNESSY, M.B. *et al.* Plasma corticosterone concentrations sensitively reflects levels of stimulus intensity in the rat. **Physiol. Behav.**, v.22, n.5, p. 821-825, 1979.
- HERD, J.A. Cardiovascular response to stress. **Physiol. Rev.**, v.71, n.1, p. 305-330, 1991.
- HIMMS-HAGEN J. Sympathetic regulation of metabolism. **Pharmacol. Rev.**, v.19, p.367-461, 1967.
- HUE, L.; FELÍU, J.E. & HERS, H-G. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. **Biochem. J.**, v.176, p.791-797, 1978.

- HULSMANN, W.C. & DUBELAAR, M.L. Lipoprotein lipases and stress hormones: studies with glucocorticoids and cholera toxin. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 875(1), p.69-75, 1986.
- JAMES, D.E.; BURLEIGH, K.M. & KRAEGEN, E.W. *In vivo* glucose metabolism in individual tissues of the rat. Interaction between epinephrine and insulin. **J. Biol. Chem.**, v.261(14), p.6366-74, 1986.
- JOHN, G.W.; DOXEY, J.C.; WALTER, D.S. & REID, J.L. The role of alpha- and beta-adrenoceptor subtypes in mediating the effects of catecholamines on fasting glucose and insulin concentrations in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 100(4), p.699-704, 1990.
- KANT, G.J.; BUNNELL, B.N.; MOUGEY, E.H.; PENNINGTON, L.L. & MEYERHOFF, J.L. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.18, p.967-971, 1983.
- _____; EGGLESTONE, T.; LANDMAN-ROBERTS, L.; KENION, C.C.; DRIVER, G.C.; & MEYERHOFF, J.L. Habituation to repeated stress is stressor specific. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.22, p.631-634, 1985.
- KAUMANN, A. J. Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. **Tips**, v.18, p.70-76, 1997.
- KNEER, N.M. & LARDY, H.A. Regulation of gluconeogenesis by norepinephrine, vasopressin, and angiotensin II: A comparative study in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} . **Arch. Bioch. Bioph.**, v. 225(1), p.187-195, 1983.
- KNOX, A.M.; STURTON, R.G.; COOLING, J. & BRINDLEY, D.N. Control of hepatic triacylglycerol synthesis. Diurnal variations in hepatic phosphatidate phosphohydrolase activity and in the concentrations of circulating insulin and corticosterone in rats. **Biochem. J.**, 180(2), 441-3, 1979.

- KONARSKA, M.; STEWART, R.E. & McCARTY, R. Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. **Physiol. & Behav.**, v.45, p.255-261, 1989.
- _____. Habituation and sensitization of plasma catecholamine responses to chronic intermittent stress: effects of stressor intensity. **Physiol. & Behav.**, v.47, p. 647-652, 1990.
- KOSOVSKII, M.I.; MIRAKHMEDOV, M.M.; KATKOVA, S.P. & MAKHKAMOVA, R.U. Characteristics of disorders of carbohydrate metabolism in rats with stress. **Probl. Endokrinol. (Mosk)**, v.34(1), p.48-51, 1988.
- KOWALSKI, T.J.; WU, G. & WATFORD, M. Rat adipose tissue amino acid metabolism *in vivo* as assessed by microdialysis and arteriovenous techniques. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. E613-E622, 1997.
- KRAUS-FRIEDMANN, N. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. **Physiol. Reviews**, v.64(1), p.170-259, 1984.
- KRULICH, L. *et al.* The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. **Neuroendocrinology**, v. 16, p.293-311, 1974.
- LAFONTAN, M. & BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J. Lipid Res.**, v.34, p. 1057-1091, 1993.
- _____.; BOUSQUET-MELOU, A.; GALITZIKY, J.; BARBE, P.; CARPÉNÉ, C.; LANGIN, D.; BERLAN, M.; VALET, P.; CASTAN, I.; BOULOUMIÉ, A. & SAULNIER-BLACHE, J-S. Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. **Obes.Res.**, v.3 (supl.4), p.507s-514s, 1995.

- LESCOAT, G. *et al.* Influence de sexe sur les modalités de response de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrealien aux agressions emotionelles et somatiques chez le rat. **Comp. Rend. Soc. Biol.**, v.164, p. 2106-2113, 1970.
- LIN, E.C.C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Ann. Rev. Biochem.**, v.46, p.765-795, 1977.
- LUGER, A. *et al.* Hormonal responses to the stress of exercise. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.245, p.273-280, 1988.
- MANGIAPANE, E.H. & BRINDLEY, D.N. Effects of dexamethasone and insulin on the synthesis of triacylglycerols and phosphatidylcholine and the secretion of very-low-density lipoproteins and lisophosphatidylcholine by monolayer cultures of rat hepatocytes. **Biochem. J.**, v. 233, p.151-160, 1986.
- MARCONDES, F.K. **Influência do sexo e das fases do ciclo estral sobre a reação de estresse em ratos.** Tese (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1995. 58p.
- _____.; VANDERLEI, L.C.M.; LANZA, L.L.B.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.74, p.663-669, 1996.
- MARPLES, D.N. *et al.* Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. **J. Anim. Sci.**, v. 35, n. 3, p. 576-579, 1972.
- MASON, J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom. Med.**, v.30, p.576-607, 1968a.
- _____. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom. Med.**, v.30, p.631-653, 1968b.
- MILLS, F.J. & CHIR, B. The endocrinology of stress. **Aviat. Space Environ. Med.**, v.56, p.642-650, 1985.

- MURISON, R.; OVERMIER, J.B. & SKOGLUND, E.J. Serial stressors: prior exposure to a stressor modulates its later effectiveness on gastric ulceration and corticosterone release. **Behav. Neural Biol.**, v.45, p.185-195, 1986.
- 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.**, v.43, p.41-46, 1988.
- NOMURA, S.; WATANABE, M.; UKEI, N. & NAKAZAWA, T. Stress and beta-adrenergic receptor binding in rat's brain. **Brain Res.**, v.224 (1), p. 119-203, 1981.
- PARÉ, W.P. & REDEI, E. Sex differences and stress response of WKY rats. **Physiol. & Behav.**, v.54, n.6, p. 1179-1185, 1993.
- PAULETTO, P.; SCANNAPIECO, G. & PESSINA, A.C. Sympathetic drive and vascular damage in hypertension and atherosclerosis. **Hypertension**, v.17 (supl.III), p.III75-81, 1971.
- PFISTER, H.P. The glucocorticosterone response to novelty as a psychological stressor. **Physiol. Behav.**, v.23, p.649-652, 1979.
- PILKIS, S.J. & EL-MAGHRABI, M.R. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p.755-83, 1988 .
- PITMAN, D. L.; OTTENWELLER, J.E. & NATELSON, B.H. Plasma corticosterone levels during presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. **Physiol. Behav.**, v.43, p.47-55, 1988. .
- PITTNER, R.A ; FEARS, R. & BRINDLEY, D.N. Effects of cyclic AMP, glucocorticoids and insulin on the activities of phosphatidate phosphohydrolase, tyrosine aminotransferase and glycerol kinase in isolated rat hepatocytes in relation to the control of triacylglycerol synthesis and gluconeogenesis. **Biochem. J.**, v.225, p.455-462, 1985a.

- _____. Interactions of insulin, glucagon and dexamethasone in controlling the activity of glycerol phosphate acyltransferase and the activity and subcellular distribution of phosphatidate phosphohydrolase in cultured rat hepatocytes. **Biochem. J.**, v.230, p.525-534, 1985b.
- POGÁTSA, G.; TAMÁS Jr., J. & DUBECZ, E. Effect of catecholamines on insulin secretion and liver glycogenolysis in the rat. **Horm. Metab. Res.**, v.10, p.378-381, 1978.
- POLLARD, I. *et al.* Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization to sexual status in the female laboratory rat. **Behav. Biol.**, v.14, p. 103-108, 1975.
- POPOVIC, V. & POPOVIC, P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. **J. Appl. Physiol.**, v.15, p.727-728, 1960.
- PORTE, D. Sympathetic regulation of insulin secretion. **Arch. Int. Med.**, v.123, p.252-260, 1969.
- _____. & ROBERTSON, R.P. Control of insulin secretion by catecholamines, stress and the sympathetic nervous system. **Fed. Proc.**, v.32, p.1792-1796, 1973.
- POTTER, D.E. & ELLIS, S. Isoproterenol- and epinephrine-induced changes in blood glucose and tissue glycogen levels in normal and diabetic rats: the influence of alteration in endogenous insulin levels and state of nourishment. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.193, p.576-584, 1975.
- RIEGLE, G.D. Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. **Neuroendocrinology**, v.11, p. 1-10, 1973.
- RODRIGUES, M.L.V.; MARCONDES, F.K. & SPADARI-BRATFISCH, R.C. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level, and estrous cycle in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.73, p. 602-607, 1995.
- SELYE, H.A. Syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v.138, n.1, p.32, 1936.
- _____. **The stress of life.** MacGraw-Hill Books Inc.; New York, 324pp., 1956.

- SHEN, Y-T.; ZHANG, H. & VATNER, S.F. Peripheral vascular effects of beta-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.268, p.466-473, 1994.
- SLAVIN, B.G.; ONG, J.M. & KERN, P.A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid Res.**, v.35, p.1535-1541, 1994.
- SOUZA, H.M.; HELL, N.S.; LOPES, G. & BAZOTTE, R.B. Synergistic effect of counterregulatory hormones during insulin-induced hypoglycemia in rats: participation of lipolysis and gluconeogenesis to hyperglycemia. **Chung. Kuo. Yao. Li. Hsueh. Pao.**, v.17(5), p.455-9, 1996.
- SPADARI, R.C. & DE MORAES, S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effects of noradrenaline and isoproterenol: role of adrenal corticosteroids. **Gen. Pharmacol.**, v.19, n.4, p.553-557, 1988.
- _____.; BASSANI, R.A. & DE MORAES, S. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. **Gen. Pharmacol.**, v.19, n.1, p. 129-135, 1988.
- SPADARI-BRATFISCH, R.C.; SANTOS, I.N.; VANDERLEI, L.C.M. & MARCONDES, F.K. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.77, p.432-440, 1999.
- TAVERNIER, G.; GALITZKY, J.; BOUSQUET-MÉLOU, A.; MONTASTRUC, J.L. & BERLAN, M. The positive chronotropic effect induced by BRL37344 and CGP12177, two beta-3 adrenergic agonists, does not involve cardiac beta adrenoceptors but baroreflex mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.263, p.1083-1090, 1992.
- TITOV, V.N. & PITSIN, D.G. The effect of glucose and cycloheximide on glycerolipid biosynthesis in the rat liver. **Vopr. Med. Khim.**, v.31(6), p.35-40, 1985.

- U'PRICHARD, D.C. & KVETNANKY, R. Catecholamines and stress: In: **Catecholamines and Stress: Recent Advances**. E. USDIN; R. KVETNANSKY & I.J. KOPIN (ED). Pergamon Press, New York, p.299-308, 1980.
- VAN DE KAR, L.D.; RICHARDSON-MORTON, K.D. & RITTENHOUSE, P.A. Stress: Neuroendocrine and Pharmacological Mechanisms. **Meth. Ach. Exp. Pathol. Bas. Karger**, v.14, p.133-173, 1991.
- VAN LIEFDE, I.; VAN WITZENBURG, A. & VAUQUELIN, G. Multiple beta adrenergic receptor subclasses mediate the *I*-isoproterenol-induced lipolytic response in rat adipocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 262, n. 2, p. 552-558, 1992.
- 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 footshock stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.74, p.670-678, 1996.
- VOGEL, W.H. & JENSH, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. **Neurosci. Lett.**, v.87, p.183-188, 1988.
- YAMAUCHI, T.; IWAI, M.; KOBAYASHI, N. & SHIMAZU, T. Noradrenaline and ATP decrease the secretion of triglyceride and apoprotein B from perfused rat liver. **Pflugers Arch.**, v. 435(3), p. 368-74, 1998.
- YOREK, M.A ; RUFO, G.A. & RAY, P.D. Gluconeogenesis in rabbit liver.III-The influences of glucagon, epinephrine, α - and β -adrenergic agents on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. **Bioch. Bioph. Acta** , v.632, p.517-526, 1980.
- YOSHIDA, T. The antidiabetic beta-3-adrenoceptor agonist BRL 26830^A works by release of endogenous insulin. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55(1 suppl), p. 237S-241S, 1992.
- WIELAND, O. Eine Enzymatische Methode zur Bestimmung von Glycerin. **Biochemische Zeitschrift**, v. 329, p. 313-319, 1957.

WOLFE, R.R.; SHAW, J.H. & DURKOT, M.J. Energy metabolism in trauma and sepsis: the role of fat. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.111, p.89-109, 1983.

5. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Os dados obtidos durante o desenvolvimento desta tese foram organizados e constam no trabalho, a ser submetido à publicação na revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*, apresentado a seguir:

Plasma Levels Of Corticosterone, Glucose, Glycerol And Triacylglycerols In Response To Beta-Adrenoceptor Agonists Infusion In Footshock Stressed Rats.

**Josiane Lombardi Verago, Dora Maria Grassi-Kassisse
and Regina Célia Spadari-Bratfisch**

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

Author for correspondence: R.C.Spadari-Bratfisch

Depto. Fisiologia e Biofísica

Instituto de Biologia – UNICAMP

13081-970 – Campinas – SP

Brasil

FAX number: 55-19-289 3124

e-mail: rspabrat@obelix.unicamp.br

Note: This paper is part of the Master Thesis of Josiane Lombardi Verago

ABSTRACT

Stress hormones can cause alterations in metabolic functions at the adipose tissue and liver. Moreover, repeated footshock stress induce alterations on the sensitivity to beta-adrenergic agonists in the rat white adipocytes lipolytic response. Therefore, our objective was to determine in fed and conscious male rats submitted to three daily footshock stress sessions: 1) plasma corticosterone, glucose, glycerol and triacylglycerols levels; 2) plasma glucose, glycerol and triacylglycerols levels in response to beta-adrenergic agonists infusion. Our results have shown that plasma corticosterone level increased significantly after each stress session while triacylglycerols increased after the first session and glucose increased after the second and third sessions. Glycerol level did not show any alteration after stress. These results suggest that repeated footshock stress might induce metabolic changes, driven towards glucose instead of triacylglycerols release by hepatic tissue, probably by using the glycerol as one of the substrates in both pathways. Stressed animals were more sensitive to noradrenaline plus prazosin and to isoproterenol infusion, maintaining elevated plasma glucose level and increasing the plasma glycerol and triacylglycerols levels. Probably, the higher sensitivity to isoproterenol and noradrenaline in stressed animals is related to the permissive influence of plasma corticosterone. Only BRL37344 increased the plasma glycerol level in stressed rats probably because beta3-adrenoceptors seem not to be involved in the hepatic triacylglycerols synthesis, allowing the glycerol backlog in the plasma.

KEY WORDS: *in vivo* – stress – footshock – glucose – glycerol – triacylglycerols – triglycerides – catecholamines – beta-adrenergic – corticosterone – infusion – catheterization.

INTRODUCTION

At stress conditions plasmatic level of hormones such as catecholamines, glucocorticoids and glucagon are increased and their effects on tissues that are involved in the metabolism of carbohydrates and lipids are opposite to the effects of insulin (1,2,3).

Endogenous catecholamines, mainly adrenaline, stimulate the glycogenolysis and gluconeogenesis in the hepatic cells of rats (4,5,6,7,8,9,10). Furthermore acting on alpha-adrenoceptors, endogenous catecholamines stimulate the release of glucagon by the alpha-pancreatic cells and inhibit the release of insulin by the beta-pancreatic cells (11,12) while beta-adrenergic agonists can stimulate the insulin release (13,14). Corticosterone has a permissive effect on the glycogenolytic and gluconeogenic effects of adrenaline and glucagon (6).

Among other effects endogenous catecholamines, glucagon and other beta-adrenergic agonists stimulate the lipolytic activity in the white adipocytes of rats releasing free fat acids and glycerol to the plasma (15,16). In adipocytes, glucocorticoids also have a permissive role in the maintenance of the lipolytic response to catecholamines (17). Liver is considered the major tissue which clears the plasmatic glycerol (18) using it as a gluconeogenic substract (1,2,3,19) or as a subtract to the triacylglycerols synthesis (1,2,3). Catecholamines, glucocorticoids, glucagon and free fatty acids can stimulate the synthesis of triacylglycerols from glycerol and fatty acids in the hepatic cells mainly through stimulation of phosphatidate phosphohydrolase (1,2,3,20) whose synthesis as well as activity are stimulated by glucocorticoids (1,2,3,21).

Triacylglycerols can be incorporated in very-low-density lipoproteins and released to the circulation (1,2,3,22). In culture of rat hepatocytes it was observed that dexamethasone increases the very-low-density lipoproteins secretion (23).

It has been previously reported that repeated footshock stress induces alterations on the sensitivity to catecholamines in cardiac tissue (24,25) and in adipocytes isolated from rats (26), and that these alterations depend on the high level of corticosterone released during the stress reaction (27). However, these alterations were observed in isolated tissues. Their physiological meaning must be demonstrated *in vivo*.

Thus the objective of this report was to determine plasma level of corticosterone, glucose, glycerol and triacylglycerols levels in fed and conscious male rats submitted to footshock stress. Moreover, we analyzed the plasma level of these compounds during and after i.v. infusion of isoproterenol, noradrenaline or BRL37344.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 250 to 350 g at the beginning of the experiments were used. The animals were housed in individual cages (30 x 18 x 20 cm) in a temperature controlled room (22° C), with a 12 h light/12 h dark cycle with lights on at 6:30 a.m. Standard laboratory chow and tap water were available *ad libitum*. During the experiments the animals were cared for in accordance with the principles for the use of animals in research and education, and the Ethical Committee, following the *Statement of Principles*, which have been adopted by the FASEB Board and, approved the experimental protocols (CEE-IB-UNICAMP, protocol n° 077-1, 06/08/2000).

Blood Vessel Catheterization

Under Xylazine (50 mg/Kg) and Ketamine (0.01mg/Kg) anesthesia, animals were catheterized by inserting a catheter (PE20 tubing) into the left carotid artery hermetically connected to a PE50 tubing that was exteriorized at the dorsal interscapular region where it was fixed at the animal skin (28). This method allows collecting blood samples from unanesthetized undisturbed freely moving rats. Catheters were previously siliconized and filled with sodium citrate (5 mM). In the animals, which were designed to receive drug infusion, the left jugular vein was also catheterized.

Stress Procedure

Rats were individually submitted to three daily sessions of unsignaled inescapable footshock. The animals were placed into a Plexiglas chamber (26 x 21 x 26 cm) provided with a grid floor made up of stainless-steel rods (0.3 cm in diameter and spaced 1.0 cm apart). During the 30 min of footshock sessions, which were held between 7:30 and 11:00 a.m., footshocks were delivered by a constant current i.c. source controlled by a microprocessor-based instrument constructed at the Biomedical Engineering Center of the "Universidade Estadual de Campinas". Current intensity was 1.0 mA and duration was 1.0 sec at random intervals of 5-25 sec with a mean interval of 15 sec. After the end of each footshock stress session, the animals were returned to their cages.

Control Procedure

At the first day of experiment, each animal was placed into the footshock cage where it remained for 30 min before returning to the animal facilities room. During this period the footshock cage remained turned off (day 0). In the following three days this procedure was repeated with the animals of the control group, whereas animals designed to the stress group were submitted to the procedure described at previous item. Some animals were catheterized to be used as blood donators.

Experimental Design 1

Animals remained at the animal care facilities at least for one week before being submitted to the experimental protocol. During this period, rats were handled during 15 min over five successive days. Then, animals left carotid artery were catheterized and for the next 48 h rats were allowed to recover from surgery. Experiments began 48 h after the catheterization surgery and were carried out for the next four days. Everyday rats were brought to a silent room where they stayed for 60 min. Then a polyethylene tubing extension (25 cm - PE50) filled with 0.09% NaCl was connected to the catheter external tip. Blood samples (500 μ l) were withdrawn, and this volume was replaced with 0.9% NaCl solution. Immediately after each blood sampling, catheters were filled with 5 mM sodium citrate solution and closed. Everyday, blood samples were collected before and after animals were placed into the experimental cage. Immediately after collection of the second blood sample animals were returned to the animal care facilities.

Experimental Design 2

In this group catheterization was performed after the second footshock session. At the next day, immediately after the third footshock or control session, a blood sample (500 μ L) was withdrawn (-15 min) from the catheterized artery as above described. Blood volume was replaced with blood collected from a naive donor animal. Another sample was withdrawn after 15 min (0 min), when drug infusion started. Blood samples were also obtained at 5, 15, 30, 45 and 60 min after infusion has been installed. Infusion was maintained for 30 min.

Through the catheter implanted in the left jugular vein rats received one of the following beta-adrenergic agonists: isoproterenol (0.4nmol/Kg.min), noradrenaline (5.0 μ g/Kg.min), or

BRL37344 (0.4nmol/Kg.min). Noradrenaline was infused also with prazosin. In this case, immediately after the third session rats received a intraperitoneal injection of prazosin (0.2 mg/Kg). After 30 min infusion of the noradrenaline (5.0µg/Kg.min) plus prazosin (8.3µg/Kg.min) was started.

Plasmatic Determination

All blood samples were collected into plastic vials immerse in an ice water bath and immediately centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 4°C. Aliquots of plasma were removed and stored at - 20°C until the moment of assays for determination of plasma corticosterone, glucose, glycerol and triacylglycerols level. Plasmatic glucose was measured by the glucose oxidase method (commercial kit Laborlab S/A, Brazil). Plasmatic corticosterone was determined by radioimmunoassay (commercial kit ICN Pharmaceuticals, Inc., EUA). For glycerol determination plasma was previously deproteinized (29) and enzymatically assayed (30). Plasmatic triacylglycerols were measured by enzymatic method (commercial kit Laborlab S/A, Brazil).

Drugs and Chemicals

ATP, Bovine serum albumine (fraction V), glycerol phosphate dehydrogenase type I from rabbit muscle, glycerol kinase from *Candida micoderma*, (-)-isoproterenol, NAD, (-)-norepinephrine, prazosin HCl and sodium citrate from Sigma Chemical Company (USA); BRL37344 from Tockris Cookson (St. Louis, MO, USA); Xylazine from Bayer S.A (Brazil); Ketamine from Konig S.A (Argentina)

Statistical Analysis

Data were expressed as means $\pm$ SEM. Comparison between the plasmatic level of each compound before and after control or stress procedure during the four successive days of experiment (experimental design 1) and between the plasmatic level at every time during or after drug infusion (experimental design 2) were analyzed with the two-way ANOVA for repeated measures, followed by Tukey's test. Plasma corticosterone level of control and stressed rats were also compared through the Student's *t*-test for dependent and independent variables. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of footshock stress on plasma corticosterone, glucose, glycerol and triacylglycerols level.

Figure 1 shows plasma corticosterone level in conscious fed rats before and after footshock stress. When Student's *t*-test was used to compare the level of corticosterone before (B) and after (A) the control or stress procedure in each one of the experimental days, we observed that the level of corticosterone after (A) control procedure were not significantly different of the level before (B); in the footshock group the level after (A) stress were higher than level before (B) at days 1 and 2 ($P < 0.05$). At day 3 level of corticosterone after (A) stress were higher only in comparison to the level in control group after (A) the control procedure at the same day ($P < 0.05$). When ANOVA for repeated measures was used to analyze all groups together, in the control group plasma corticosterone level was not altered before (B) or after (A) the control procedure, during the four days of experiments. But in the footshock stress group plasma corticosterone level was higher after (A) footshock stress only at day 3, in comparison to values obtained in the control group and in the footshock group before footshock at days 1 and 2 and after footshock at day 1 ($P < 0.05$).

Figure 2 shows that in the control group plasma glucose level was not significantly different before (B) or after (A) the control procedure at the four days. In the footshock group at day 2 and 3 plasma glucose level had an increase after (A) footshock in comparison to values before (B) footshock ($P < 0.05$). Furthermore at day 3 the plasma glucose level was higher than all values in the control group, and in the footshock stress group except in day 2 after footshock ($P < 0.05$). Plasma glycerol level was not significantly different in both control and footshock groups after (A) or before (B) control procedure or footshock stress at days 1, 2 and 3. Plasma triacylglycerols level (Figure 2) was not significantly different before (B) or after (A) the control procedure in any of the four days. In the footshock group, plasma triacylglycerols

level was increased after (A) footshock stress only at day 1 in comparison to value before (B) footshock ($P < 0.05$).

Effect of isoproterenol, noradrenaline, noradrenaline and prazosin or BRL37344 infusion on plasma glucose, glycerol or triacylglycerols level

After the third footshock session, rats remained into their homecages until glucose plasma level decreased to value which was not significantly different from control (15 min). At that time i.v. infusion of saline solution (NaCl 0.09% m/v), isoproterenol (0.4nmol/Kg.min), noradrenaline (5.0ug/Kg.min), or BRL37344 (0.4nmol/Kg.min) was installed.

Infusion of saline solution in control animals did not significantly altered plasma level of glucose, glycerol or triacylglycerols (Figure 3). As above mentioned, immediately after the third session plasmatic glucose level was higher in stressed than in control rats. During the following 15 min glucose level in plasma of stressed rats decreased toward the value obtained in control rats. In control group isoproterenol (0.4nmol/Kg.min) induced an increase on plasma glucose level at 5 min that returned to basal even during the infusion ($P < 0.05$) (Figure 3). In footshock stressed rats plasma glucose level was higher than control during infusion and 15 min after but not 30 min after the end of the infusion (60 min) ($P < 0.05$). Isoproterenol infusion in control and footshock stressed animals did not have any effect on plasma glycerol level (Figure 3). However, in control animals isoproterenol induced an increase in plasma triacylglycerols level only at 60 min from the start of the infusion that means 30 min after the end, whereas in footshock stressed animals the same compound induced an earlier increase in plasma triacylglycerols level, which was already significantly at 45 and 60 min compared to the values obtained immediately before infusion ($P < 0.05$; Figure 3).

Noradrenaline (5.0ug/Kg.min) did not have any significant effect on plasma glucose or glycerol level in both groups, control and footshock (Figure 4) except for the comparison

between times 5 and 45 min in the stressed animals which were significantly different from each other ($P < 0.05$). Noradrenaline infusion induced a similar profile of variation on plasma triacylglycerols level at both, control and footshock stressed rats (Figure 4), with the level of triacylglycerols significantly lower in stressed than control rats, at 15 min after infusion had been started and 30 min after the end of infusion (Figure 4). Since noradrenaline has a potent vasoconstrictor effect that might affect the release and/or clearance of substrates in several tissues, we analyzed noradrenaline effect in rats which had received prazosin before and during noradrenaline infusion.

An i.p. injection of prazosin did not affect plasmatic level of glucose, glycerol and triacylglycerols in control rats (Figure 5). However, in stressed rats which have received prazosin, plasma glucose level remained high during the 30 min following prazosin i.p. injection so that when infusion started, levels were higher in stressed than in control rats (Figure 5).

When infusion of noradrenaline plus prazosin started there was a tendency to increase the plasmatic level of glucose although not significantly different from level at time 0, both in control and stressed rats. However, after the end of the infusion, plasmatic level of glucose showed a tendency to decrease towards basal level in control rats whereas level of glucose remained higher in stressed than in control rats, even 30 min after the end of infusion (Figure 5). A similar tendency was observed in glycerol plasmatic level during the infusion of noradrenaline plus prazosin. However there was a peak of glycerol level in plasma from stressed rats 15 min after the end of the infusion when level of triacylglycerols were also higher in stressed than in control rats (Figure 5).

BRL37344 (0.4nmol/Kg.min) did not have any significant effect on plasma glucose and triacylglycerols level in both groups, control and footshock (Figure 6). BRL37344 infusion had no significant effect on plasma glycerol level in control rats (Figure 6) but in footshock

stressed rats plasma glycerol level increased towards a peak at the end of the infusion (30 min) regarding to 0, 5 and 15 min in control group and decreased after the infusion had been finished (Figure 6).

DISCUSSION

It is known that increase of plasma corticosterone occurs in response to stress and that it is directly related to the stress intensity being this hormone an indicative of the stress condition (31,32). Plasma catecholamines level also enhances during the stress reaction (31,33).

Results in Figure 1 show that 48 h after surgery under ketamine anesthesia rats present $26,1 \pm 2,7$ μg of corticosterone/dL of plasma. This value is significantly higher than those reported in a previous publication, when we observed in male rats under the sedative effect of sodium pentobarbital a basal plasma corticosterone of 13.0 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (26) but values reported now are not significantly different from those reported by DE BOER *et al.* (31,34) who have measured plasma corticosterone level in fed rats which have been transferred to a novel cage and environment, as we have done. Moreover, plasma corticosterone level of control rats remained unchanged in the following days. Thus, the high level of plasma corticosterone seems to be typical of conscious rats brought into a different room and submitted to the procedure of blood collection while freely moving into the cage. Our data also show that after remaining into the footshock cage for 30 min but not receiving any footshock, plasma corticosterone level of rats did not show any alteration indicating that during this period animals did habituate to this procedure. These data are also in accordance with those of DE BOER *et al.* (31,34) who have shown that at this time plasma noradrenaline and adrenaline levels are already returned to basal level. However, when rats received footshocks, plasma corticosterone level increases, as expected, and it seems that with repetition of the stressor stimulus, the response is even more pronounced since after the third session the level is higher than after the first and second sessions, indicating that animals did not have adapted to stressor. Many authors have shown that in rats, plasma corticosterone responses were reduced following repeated presentation of noise (35,36), handling (37), novelty (38,39,40) or

restraint (41,42,43), whereas with the use of relative intense stressors like footshock (44,45,46), cold exposure (45), forced running (45,46) or a combination of restraint, light, noise and tailcutting (47), no such adaptation effect was detected. Moreover, the animals showed a higher plasma corticosterone level before the third footshock session, what indicates that with the repetition of the stressful stimulus, some anticipation of the response may occur. Plasma glucose level followed a pattern which was similar to plasma corticosterone level. In footshock stressed rats plasma glucose level increased significantly after the second and the third stress sessions (Figure 2). This is probably a consequence of the permissive effect of corticosterone on catecholamines effects plus glucagon action stimulating gluconeogenesis and glycogenolysis at hepatic cells (6) and of endogenous catecholamines alpha-adrenergic effects inhibiting insulin secretion (11,12). After the first footshock session, the increase in plasma glucose level was not significant although plasma corticosterone had significantly enhanced (Student's *t*-test; $P < 0.05$). Although, in contrast to the plasma glucose that increases progressively with the repetition of stress, plasma triacylglycerols level did not enhance at days 2 and 3 but is significantly higher than control after the first footshock session (Figure 2). This result suggests a focalization of the hepatic function in the glucose rather than triacylglycerols production, as stress is repeated, probably utilizing the glycerol released by the adipose tissue as one of the gluconeogenic substrates and so maintaining plasma glycerol level unchanged after stress, despite of the adrenergic stimulation of the lipolysis in the white adipose tissue (48). All together, these results suggest that after repeated stress an extensive metabolic response is coordinated to maintain high plasma level of glucose. This post-stress hyperglycemia seems to be enhanced as stressful stimulus is repeated, suggesting a sensitization of the stress response.

Since we have previously shown that after this same stress protocol, cardiac tissue and adipocytes present supersensitivity to the effect of isoproterenol and subsensitivity to

noradrenaline (49) and BRL (26), we studied the effect of the infusion of these compounds on plasma level of glucose, glycerol and triacylglycerols in stressed rats.

In control rats infusion of isoproterenol induced an increased glycemia with a peak at the 5th min followed by a slow decrease towards basal value even during infusion. This time course is probably a consequence of isoproterenol effect stimulating insulin secretion (50,51,52,53). In footshock stressed rats glycemia remained higher than in control rats during isoproterenol infusion, suggesting that in stressed rats, despite of a probable insulin effect, the glycogenolysis and gluconeogenesis were even higher than in control animals, likely due to the endogenous catecholamines effect (10) or to a desensitization of tissues to the insulin effect (54,55). If isoproterenol stimulated the insulin release reducing neoglycogenesis, then plasmatic glycerol could be used by the liver in the triacylglycerols synthesis, maintaining the plasmatic level of glycerol unchanged despite of a probable increase in the lipolysis stimulated by the infused isoproterenol (56,57). Furthermore the late corticosterone permissive effects to the endogenous catecholamines action could have enhanced this metabolic pathway, because in stressed rats the increase in the plasmatic triacylglycerols level was faster and higher than in control animals.

Although noradrenaline have glycogenolytic and gluconeogenic effects on isolated hepatocytes (51) and lipolytic effects on isolated adipocytes (57), when infused in rats *in vivo*, its vasoconstrictor effect could mask its metabolic action (58). So, with noradrenaline infusion we did not obtain significant changes in plasma glucose and glycerol levels both in control and in stressed rats. However, when rats received prazosin (Figure 5) immediately after the third footshock session, we observed that glycemia did not decrease towards control level and remained higher than control during all the period of noradrenaline infusion and even until 30 min after the end of the noradrenaline infusion. On the other hand, in control rats, glucose plasma level were not modified by prazosin but were increased during the initial five minutes

of noradrenaline infusion, to slowly decrease towards control level even during the infusion. Under this condition the effect on glycemia of noradrenaline mediated by beta-adrenoceptors is similar to the effect of isoproterenol (Figure 3). Then, in stressed rats the beta-adrenergic effect of noradrenaline and isoproterenol on glycemia seems to be more pronounced than in control rats. Alpha-1 adrenoceptor antagonists, such as prazosin causes enhancement of the hepatic glycogenolysis (53,59) and impairment of glucose uptake by adipocytes (60). In control rats, these effects were not enough to causes any glycemia increase. However, in stressed rats, these effects plus the high level of catecholamines released during stress causes the observed hyperglycemia.

Addressing to the plasma triacylglycerols level, the infusion of noradrenaline induced a similar time course both in control and in stressed rats with a mild alteration which is not significant. When the effect of noradrenaline in the presence of prazosin is analyzed the pattern of response is different in stressed animals, compared to control and again, the response seems to be more sensitive to noradrenaline in stressed than in control rats. Moreover, the opposite had been reported *in vitro*, with cardiac tissue and adipocytes isolated from stressed rats which are subsensitive to the effect of noradrenaline (49,26). Certainly *in vivo* conditions are much more complex and involve several other factors which has not been controlled and subsensitivity of isolated tissues even it is present *in vivo* is not enough to overcome the effect of high level of endogenous catecholamines which probably are added to the infused exogenous noradrenaline. Moreover, *in vitro* tissues from stressed rats are supersensitive to adrenaline (26), which is also elevated in stressed rats (31).

In stressed animals, the vasoconstrictor effect of noradrenaline was enhanced, maybe reducing its release by the liver (61,62) and in control rats it was possible to observe the increase in plasma triacylglycerols level as a consequence of the noradrenergic stimulus on its synthesis by the liver (1,2,3).

BRL37344 infusion effect on the glycogenolytic and gluconeogenic functions in the liver did not alter the plasma glucose level both in control and in stressed rats. So it seems that its effect might be counterbalanced by the increase of the plasma insulin level (13,14) which would maintain unchanged the plasma glucose level. Nevertheless beta3-adrenoceptors are the predominant adrenergic receptor found in white adipocytes of rats (63), and stressed animals that had an increase in plasma glycerol level were more sensitive to BRL37344 infusion than control ones. This effect seems to be due to the corticosterone permissive effect on the lipolytic response mediated by beta3-adrenoceptors (17). Furthermore beta3-adrenoceptors seem not be involved in the hepatic triacylglycerols synthesis stimulation (64), allowing the glycerol backlog in the plasma as a result mainly of the stimulation of lipolysis in the white adipose tissue by BRL37344.

Concluding, the results presented here suggest that repeated footshock stress might induce metabolic changes driven towards glucose production instead of triacylglycerols, probably using the glycerol as one of the substrates, and although isolated adipocytes were subsensitive to noradrenaline (26), *in vivo* the response to the infusion of isoproterenol, noradrenaline and BRL37344 is more pronounced in stressed than in control rats.

REFERENCES

1. Pittner, R.A ; Fears, R. and Brindley, D.N. (1985) *Biochem. J.* **225**, 455-462.
2. Pittner, R.A ; Fears, R. and Brindley, D.N. (1985) *Biochem. J.* **230**, 525-534.
3. Brindley, D.N.; Akester, H.; Derrick, G.P.; Irvine, C.D.; Patmore, R.D.; Spencer, H.; Yule-Smith, A.; Finnerty, C.; Saxton, J.; Macdonald, I.A. and Rolland, Y. (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**, 695-705.
4. Bodo, R.C. and Benaglia, A.E. (1938) *Am. J. Physiol.* **121**, 728-737.
5. Himms-Hagen J. (1967) *Pharmacol. Rev.* **19**, 367-461.
6. Exton, J.H.; Friedman, N.; Hee-Aik Hong, E.; Brineaux, P.; Corbin, J.D. and Park, C.R. (1972) *The J. Biol. Chem.* **247**, 3579-3588.
7. Hue, L.; Felú, J.E. and Hers, H-G. (1978) *Biochem. J.* **176**, 791-797.
8. Yorek, M.A ; Rufo, G.A. and Ray, P.D. (1980) *Bioch. Bioph. Acta* **632**, 517-526.
9. Kneer, N.M. and Lardy, H.A. (1983) *Arch. Bioch. Bioph.* **225**, 187-195.
10. Pilakis, S.J. and El-Maghrabi, M.R. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 755-783.
11. Porte, D. (1969) *Arch. Int. Med.* **123**, 252-260.
12. Porte, D. and Robertson, R.P. (1973) *Fed. Proc.* **32**, 1792-1796.
13. Yoshida, T. (1992) *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 237S-241S.
14. Atef, N.; Lafontan, M.; Double, A.; Helary, C.; Ktorza, A. and Penicaud, L. (1996) *Eur. J. Pharmacol.* **298**, 287-292.
15. Slavin, B.G.; Ong, J.M. and Kern, P.A. (1994) *J. Lipid Res.* **35**, 1535-1541.
16. Lafontan, M.; Bousquet-Melou, A.; Galitziky, J.; Barbe, P.; Carpené, C.; Langin, D.; Berlan, M.; Valet, P.; Castan, I.; Bouloumié, A. and Saulnier-Blache, J-S. (1995) *Obes. Res.* **3**, 507s-514s.
17. Fain, J.N. and García-Sáinz, J.A. (1983) Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid Res.* **24**, 945-966.

18. Lin, E.C.C. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 765-795.
19. Souza, H.M.; Hell, N.S.; Lopes, G. and Bazotte, R.B. (1996) *Chung. Kuo. Yao. Li. Hsueh. Pao.* **17**, 455-459.
20. Pauletto, P.; Scannapieco, G. and Pessina, A.C. (1971) *Hypertension* **17**, 75-81.
21. Knox, A.M.; Sturton, R.G.; Cooling, J. and Brindley, D.N. (1979) *Biochem. J.* **180**, 441-443.
22. Titov, V.N. and Pitsin, D.G. (1985) *Vopr. Med. Khim.* **31**, 35-40.
23. Mangiapane, E.H. and Brindley, D.N. (1986) *Biochem. J.* **233**, 151-160.
24. Bassani, R.A and De Moraes, S. (1987a) *Gen. Pharmac.* **18**, 473-477.
25. Bassani, R.A and De Moraes, S. (1987b) *Br. J. Med. Biol. Res.* **20**, 467-470.
26. Farias-Silva, E.; Grassi-Kassisse, D.M.; Wolf-Nunes, V. and Spadari-Bratfisch, R.C. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 1719-1727.
27. Spadari, R.C. and De Moraes, S. (1988) *Gen. Pharmacol.* **19**, 553-557.
28. Popovic, V. and Popovic, P. (1960) *J. Appl. Physiol.* **15**, 727-728.
29. Kowalski, T.J.; Wu, G. and Watford, M. (1997) *Am. J. Physiol.* **273**, E613-E622.
30. Wieland, O. (1957) *Biochemische Zeitschrift* **329**, 313-319.
31. De Boer, S.F.; Koopmans, S.J.; Slinger, J.L. and Van Der Gugten, J. (1990) *Physiol. & Behav.* **47**, 1117-1124.
32. Van De Kar, L.D.; Richardson-Morton, K.D. and Rittenhouse, P.A. (1991) *Meth. Ach. Exp. Pathol. Bas. Karger* **14**, 133-173.
33. Konarska, M.; Stewart, R.E. and Mccarty, R. (1990) *Physiol. & Behav.* **47**, 647-652.
34. De Boer, S.F.; Koopmans, S.J.; Slinger, J.L. and Van Der Gugten, J. (1989) *Physiol. & Behav.* **45**, 989-994.
35. Armario, A.; Castellanos, J.M. and Balasch, J. (1984) *Behav. Neural Biol.* **41**, 71-76.
36. Borrel, J.; Torrelas, A.; Guaza, C. and Borrel, S. (1980) *Neuroendocrinology* **31**, 53-59.

37. Dobrakovova, M. and Juricovicova, J. (1984) *Exp. Clin. Endocrinol.* **83**, 21-27.
38. Basset, J.R.; Cairncross, K.D. and King, M.G. (1973) *Physiol. Behav.* **10**, 901-907.
39. File, S.E. (1982) *Physiol Behav.* **28**, 259-263.
40. Pfister, H.P. (1979) *Physiol. Behav.* **23**, 649-652.
41. Murison, R.; Overmier, J.B. and Skoglund, E.J. (1986) *Behav. Neural Biol.* **45**, 185-195.
42. Natelson, B..H.; Ottenweller, J.E.; Cook, J.A.; Pitman, D.; Mccarty, R. and Tapp, W.N. (1988) *Physiol. Behav.* **43**, 41-46.
43. Pitman, D. L.; Ottenweller, J.E. and Natelson, B.H. (1988) *Physiol. Behav.* **43**, 47-55.
44. Axelrod, J. and Reisine, T.D. (1984) *Science* **24**, 452-459.
45. Kant, G.J.; Bunnell, B.N.; Mougey, E.H.; Pennington, L.L. and Meyerhoff, J.L. (1983) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 967-971.
46. Kant, G.J.; Egglestone, T.; Landman-Roberts, L.; Kenion, C.C.; Driver, G.C.; and Meyerhoff, J.L. (1985) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **22**, 631-634.
47. Vogel, W.H. and Jensh, R. (1988) *Neurosci. Lett.* **87**, 183-188.
48. Wolfe, R.R.; Shaw, J.H. and Durkot, M.J. (1983) *Prog. Clin. Biol. Res.* **111**, 89-109.
49. Spadari-Bratfisch, R.C.; Santos, I.N.; Vanderlei, L.C.M. and Marcondes, F.K. (1999) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77**, 432-440.
50. Potter, D.E. and Ellis, S. (1975) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **193**, 576-584.
51. Pogátsa, G.; Tamás Jr., J. and Dubecz, E. (1978) *Horm. Metab. Res.* **10**, 378-381.
52. Woodson, L.C. and Potter, D.E. (1979) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **210**, 458-464.
53. John, G.W.; Doxey, J.C.; Walter, D.S. and Reid, J.L. (1990) *Br. J. Pharmacol.* **100**, 699-704.
54. Kosovskii, M.I.; Mirakhmedov, M.M.; Katkova, S.P. and Makhkamova, R.U. (1988) *Probl. Endokrinol. (Mosk)* **34**, 48-51.

55. Chaouloff, F.; Laude, D.; Merino, D.; Serrurier, B. and Elghozi, J.L. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**, R435-442.
56. Van Liefde, I.; Van Witzenburg, A. and Vauquelin, G. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**, 552-558.
57. Bousquet-Mélou, A., Galitzky, J., Carpéné, C., Lafontan, M. and Berlan, M. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, R115-R123.
58. Guimarães, S. (1986) in New aspects of the role of adrenoceptors in the cardiovascular system. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Munich, 143pp.
59. James, D.E.; Burleigh, K.M. and Kraegen, E.W. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 6366-6374.
60. Faintrenie, G. and Geloën, A. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 607-610.
61. Gardemann, A., Jahns, U. and Jungermann, K. (1991) *Am. J. Physiol.* **260**, E762-E771.
62. Yamauchi, T.; Iwai, M.; Kobayashi, N. and Shimazu, T. (1998) *Pflugers Arch.* **435**, 368-74.
63. Lafontan, M. and Berlan, M. (1993) *J. Lipid Res.* **34**, 1057-1091.
64. Evans, B.A.; Papaioannou, M.; Bonazzi, V.R. and Summers, R.J. (1996) *Br. J. Pharmacol.* **117**, 210-216.

Figure 1: Plasmatic level of corticosterone in conscious fed rats before (B) and after (A) control procedure (days 0, 1, 2 and 3) or 30 min of footshock stress. At day 0 animals of both groups were placed into the turned off footshock cage (control procedure). At days 1, 2 and 3 rats from stressed group received 120 footshocks (1.0 mA; 1.0 sec; intervals between 5-25 sec) during 30 min and rats from control group remained into the footshock cage but did not receive footshocks. Values represent means $\pm$ SEM. The number of experiments of each group is expressed between parentheses. * significantly different from footshock group before session (Student's *t*-test; $P < 0.05$); + significantly different from control group after session (Student's *t*-test; $P < 0.05$); ★ significantly different from control group before and after session at days 1,2,3 (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$); ♦ significantly different from footshock group before session at days 1,2 (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$).

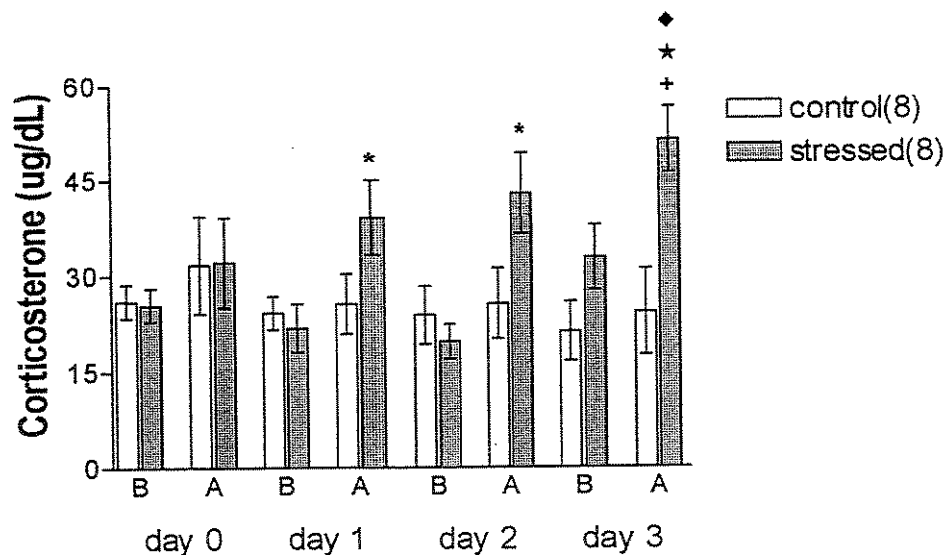


Figure 2: Plasmatic level of glucose, glycerol and triacylglycerols in conscious fed rats before (B) and after (A) control procedure (days 0, 1, 2 and 3) or 30 min of footshock stress. At day 0 animals of both groups were placed into the turned off footshock cage (control procedure). At days 1, 2 and 3 rats from stressed group received 120 footshocks (1.0 mA; 1.0 sec; intervals between 5-25 sec) during 30 min and rats from control group remained into the footshock cage but did not receive footshocks. Values represent means $\pm$ SEM. The number of experiments of each group is expressed between parentheses. ♦ *significantly different from control group before and after session, and footshock group before session (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$);* ★ *significantly different from values of control group after session and footshock group before session (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$).*

Figure 2

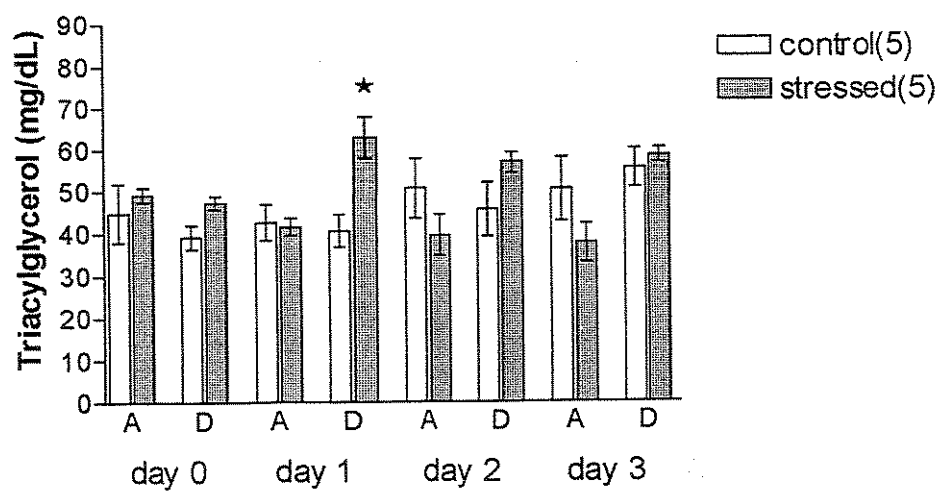
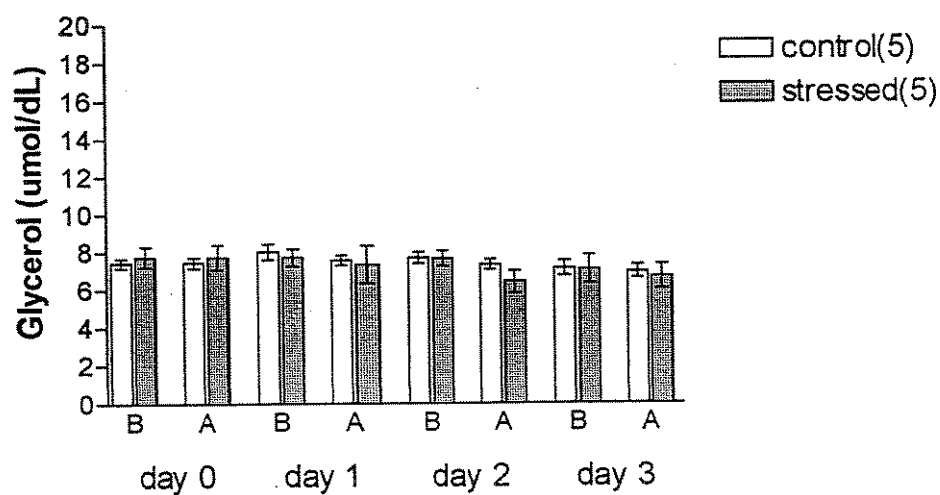
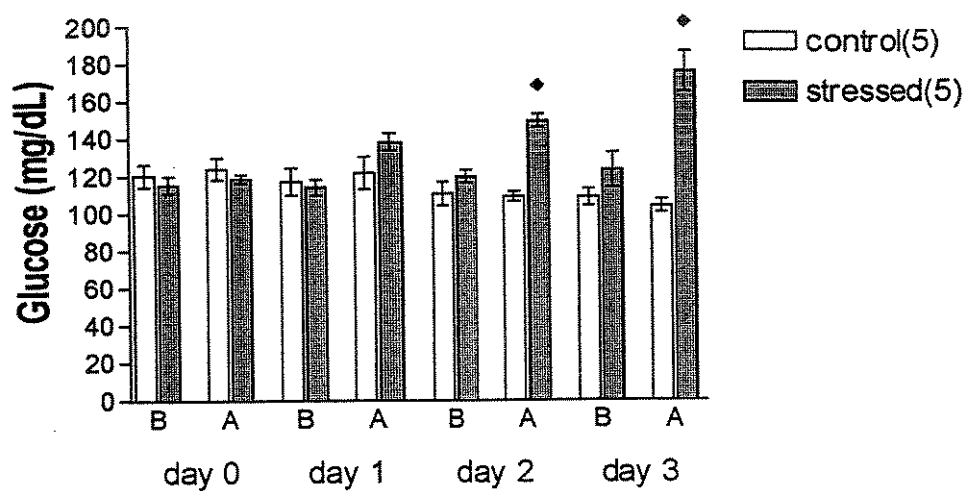


Figure 3: Effect of i.v. infusion of saline solution (NaCl 0.09 % m/v) or isoproterenol (0.04 nmol/Kg.min) in conscious fed rats on plasmatic level of glucose, glycerol and triacylglycerols after 3 daily sessions of permanence into the turned off footshock cage (control procedure) or of footshock stress during 30 minutes. Infusion began 15 min after the end of the third session. Values represent means $\pm$ SEM. The number of experiments of each group is expressed between parentheses. * significantly different from value in control group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$); + significantly different from value at 0 min (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$); ★ significantly different from value at 5, 15 and 30 min (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$); ◆ significantly different from value at -15, 0, 5, 15, and 30 min in control group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$).

Figure 3

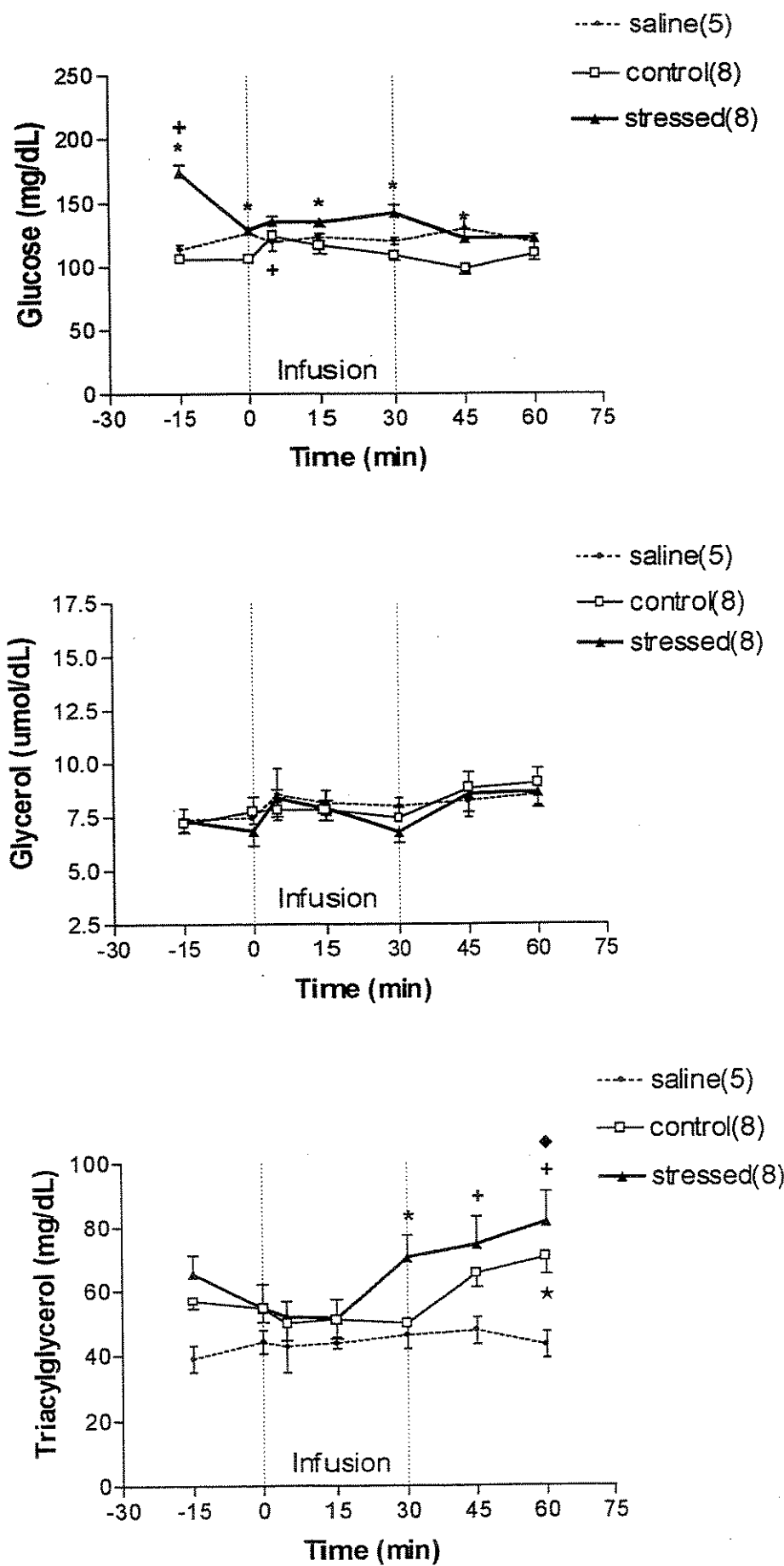


Figure 4: Effect of i.v. infusion of noradrenaline (5.0 ug/Kg.min) in conscious fed rats on plasmatic level of glucose, glycerol and triacylglycerols after 3 daily sessions of permanence into the turned off footshock cage (control procedure) or of footshock stress during 30 minutes. Infusion began 15 min after the end of the third session . Values represent means $\pm$ SEM. The number of experiments of each group is expressed between parentheses. ♦ significantly different from value at 45 min (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$); ★ significantly different from value at 0 and 30 min in footshock group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$).

Figure 4

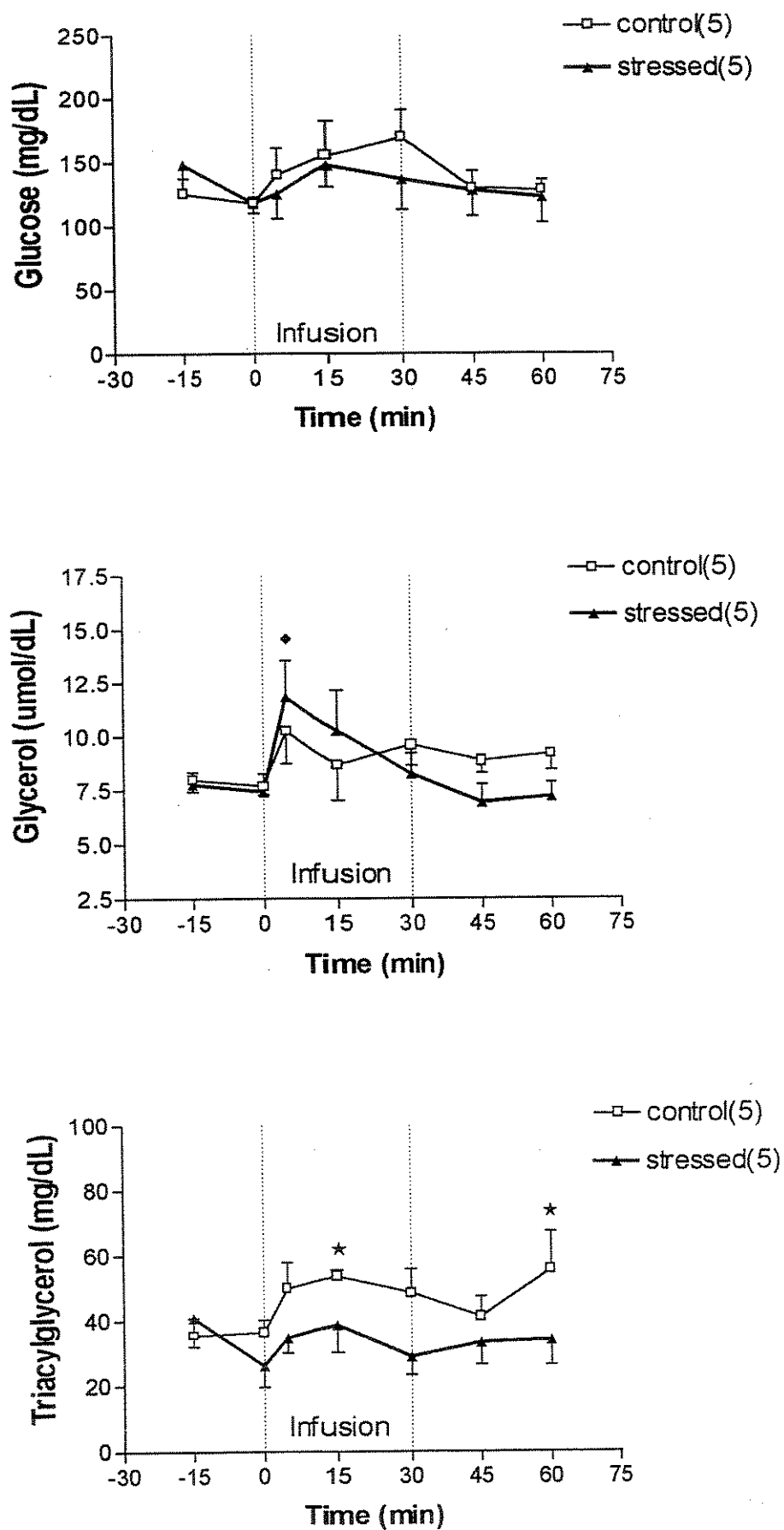


Figure 5: Effect of i.v. infusion of noradrenaline (5.0 ug/Kg.min) + prazosin (8.3 ug/Kg.min) in conscious fed rats on plasmatic level of glucose, glycerol and triacylglycerols after 3 daily sessions of permanence into the turned off footshock cage (control procedure) or of footshock stress during 30 minutes. Immediately after the third session rats received 0.2 mg/Kg of prazosin, i.p. Thirty min after the end of the third session infusion began. Values represent means $\pm$ SEM. The number of experiments of each group is expressed between parentheses.

* *significantly different from value in control group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$);*
 ★ *significantly different from value at -15 and 0 min in control group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$);* + *significantly different from value at 0 min (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$);* ◆ *significantly different from values of all the times except 45 min in control group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$).*

Figure 5

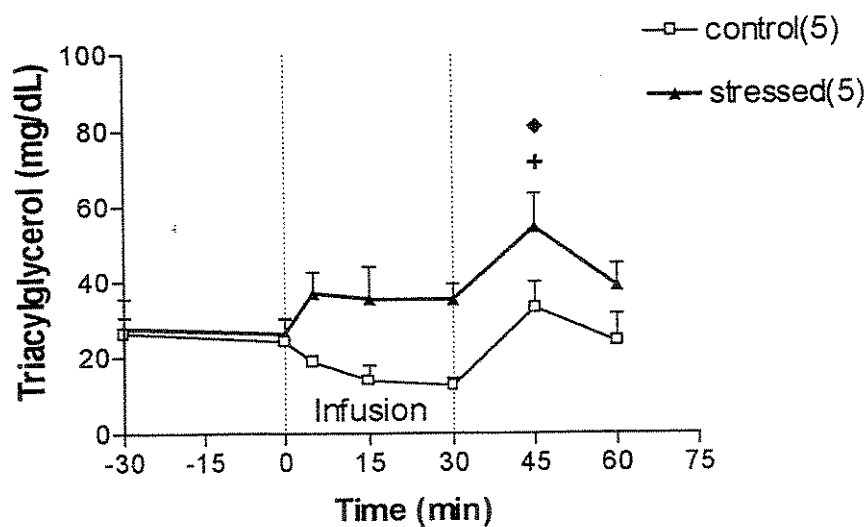
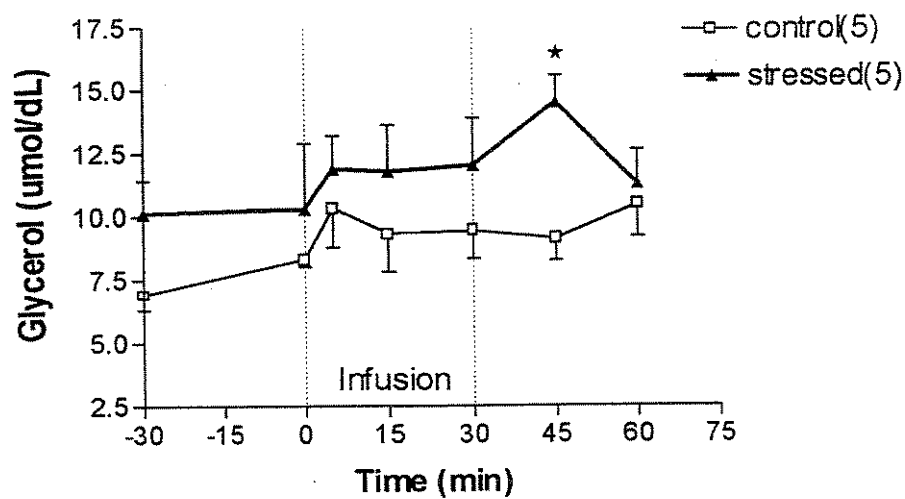
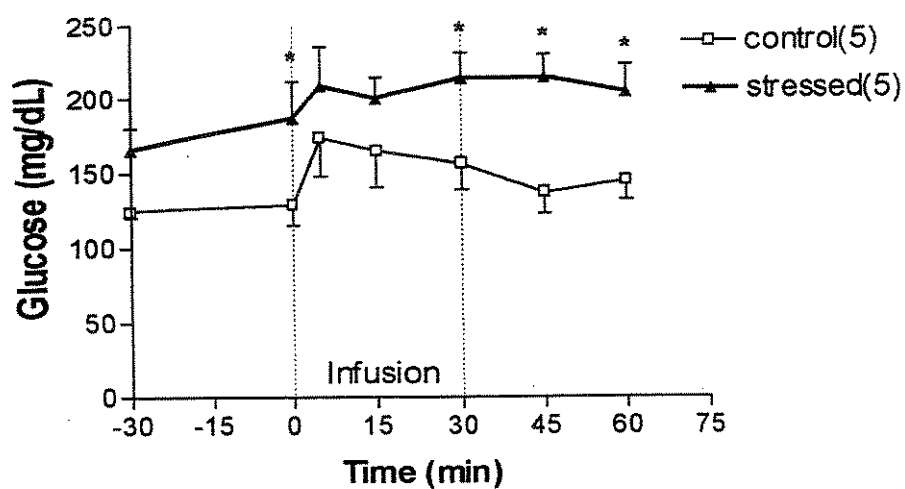
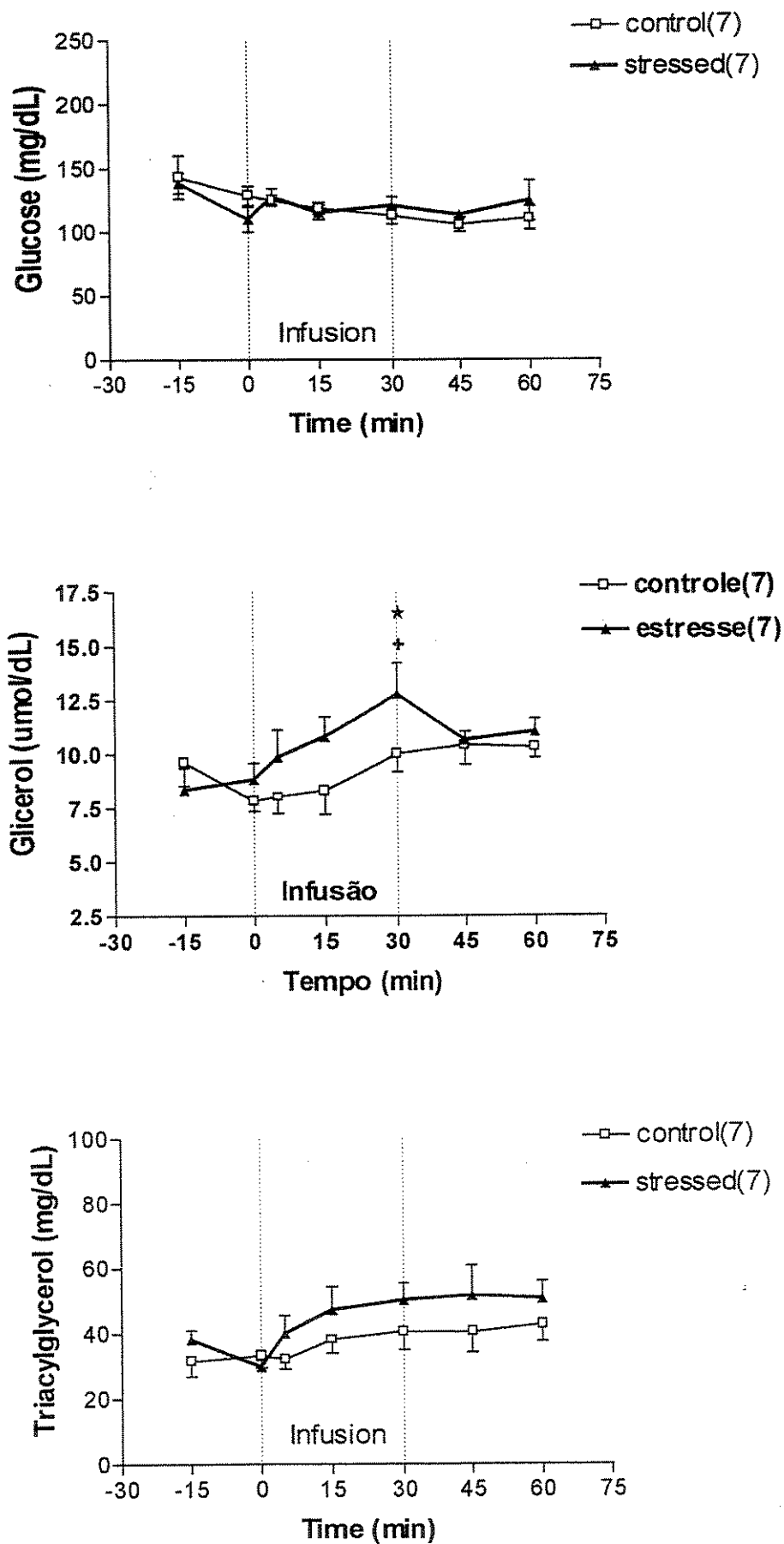


Figure 6: Effect of i.v. infusion of BRL37344 (0.04 nmol/Kg.min) in conscious fed rats on plasmatic level of glucose, glycerol and triacylglycerols after 3 daily sessions of permanence into the turned off footshock cage (control procedure) or of footshock stress during 30 minutes. Infusion began 15 min after the end of the third session. Values represent means $\pm$ SEM. The number of experiments of each group is expressed between parentheses. + significantly different from value at 0 min (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$); ★ significantly different from values at 0, 5 and 15 min in control group (ANOVA plus Tukey test; $P < 0.05$).

Figure 6



6. ANEXO



Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 077-1, sobre "Efeito do stress
sobre a sensibilidade da resposta lipotica
das catecolaminas in vivo"
sob a responsabilidade de Dr(a) Regina Spadoni Bratfish
está
de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo
Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela
Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de
6/8/1999. Este certificado expira em 6/8/2000.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº, about "....."
.....
is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian
College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of
Biology/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in/...../.....
Expiration date/...../.....

Campinas, 6 de agosto de 1999

Alba Regina M. Souza Brito
Prof(a) Dr(a)
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Luiz Carlos Ferraz L. SCA
Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP

7. APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

FeSBE

26 a 29 de agosto / Caxambu - MG

98

Certificamos que

o resumo 10- 6 intitulado "Efeito do estresse sobre a sensibilidade da resposta lipolítica às catecolaminas *in vivo*" de autoria de Verago, J.L.; Ferreira, R.C.; Grassi-Kassisse, D. M.; Spadari-Bratfisch, R. C. foi apresentado na

XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada no Hotel Glória na cidade de Caxambu-MG, de 26 a 29 de agosto de 1998.



Comissão Organizadora

FeSBE

25 a 28 de Agosto / Caxambu - MG

99

Certificamos que

O resumo n° 08.037, intitulado "Efeito do estresse sobre as concentrações plasmáticas (CP) de glicose, glicerol e triacilgliceróis mediante a infusão de agonistas beta-adrenérgicos.", de autoria: Verago, J. L.; Ferreira, R. C.; Grassi-Kassisse, D. M.; Spadari-Bratfisch, R. C., foi apresentado na

XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, realizada no Hotel Glória na cidade de Caxambu-MG, de 25 a 28 de agosto de 1999.



Comissão Organizadora