



Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato

Ricardo Vinicius Ledesma Contarteze¹, Fúlvia de Barros Manchado^{1,2}, Claudio Alexandre Gobatto¹ e Maria Alice Rostom de Mello¹

RESUMO

Introdução: O estresse alcançado durante exercício agudo/crônico é relevante, pois altos índices de estresse podem prejudicar o bem-estar dos animais. As concentrações dos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, bem como as concentrações de ácido ascórbico e colesterol das glândulas adrenais são importantes biomarcadores de estresse. **Objetivo:** Analisar a sensibilidade de diferentes biomarcadores de estresse em ratos durante exercício agudo de natação em diferentes intensidades. **Método:** Ratos (18) adaptados à natação foram submetidos a três testes de 25 minutos suportando cargas 5,0; 5,5 e 6,0% do peso corporal (PC), para obtenção da máxima fase estável de lactato (MFEL). Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos: M (n = 9), sacrificado após 25 minutos de exercício na intensidade de MFEL e S (n = 9), sacrificado após exercício exaustivo, em intensidade 25% superior a MFEL. Para comparações, um grupo controle C (n = 10) foi sacrificado em repouso. **Resultados:** As concentrações séricas de ACTH e corticosterona foram superiores após exercício em ambas as intensidades comparadas com o grupo controle (P < 0,05). As concentrações de ACTH e corticosterona do grupo S foram, ainda, maiores do que as do grupo M (P < 0,05). As concentrações de colesterol e ácido ascórbico na adrenal dos grupos exercitados (M e S) foram inferiores às do grupo controle (P < 0,05). Não houve diferença das concentrações de ácido ascórbico e colesterol da adrenal quando comparadas as duas intensidades de exercício (M e S) (P < 0,05). **Conclusão:** Todos os biomarcadores do eixo HHA apontaram alterações no nível de estresse de ratos submetidos a exercício agudo de natação; as concentrações séricas de ACTH e corticosterona mostraram-se mais sensíveis a pequenas alterações na intensidade do exercício.

ABSTRACT

Biomarkers of stress in rats exercised in swimming at intensities equal and superior to the maximal stable lactate phase

Introduction: The level of stress during acute/chronic exercise is important, since higher levels of stress may impair animal welfare. The adrenocorticotrophic (ACTH) and corticosterone hormone concentrations, as well as cholesterol and ascorbic acid con-

Palavras-chave: Exercício contínuo. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Intensidade de esforço.

Keywords: Continuous exercise. Effort intensity. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

centrations in adrenal gland, are considered an important stress biomarker. **Purpose:** To analyze the sensitivity of the different biomarkers during acute swimming exercise in different intensities performed by rats. **Methods:** Male Wistar adult rats (n = 18) previously adapted to swimming were submitted to three 25 min. swimming tests with loads of 5.0; 5.5 and 6.0% of their body weight (BW), for maximum lactate steady state (MLSS) determination. After MLSS attainment, the animals were divided into two groups: M (n = 9) sacrificed shortly after a 25 min. session of exercise at the MLSS intensity or S (n = 9) sacrificed after exhaustive exercise at intensity 25% above MLSS. For comparison purposes, a control group C (n = 10) was sacrificed in rest. **Results:** Serum ACTH and corticosterone concentrations were higher after exercise for the two groups (M and S) when compared with control group C (P < 0.05). The group S presented higher concentrations for both hormones in relation to the group M (P < 0.05). The concentrations of the cholesterol and ascorbic acid in adrenal were lower after exercise for the two groups (M and S) when compared with control group C (P < 0.05). No significant differences in adrenal ascorbic acid and cholesterol levels were observed when the two exercise intensities (M and S) were compared (P < 0.05). **Conclusion:** All biomarkers of HPA activity pointed alterations in the stress level of the rats submitted to acute swimming exercise. ACTH and corticosterone serum concentrations showed to be more sensitive to small alterations in the effort intensity.

INTRODUÇÃO

O exercício físico é, conhecidamente, um estímulo estressor, tanto em seres humanos como em animais, que conduz a inúmeras alterações fisiológicas visando suprir o aumento da demanda energética e a busca de uma nova situação de homeostase⁽¹⁻³⁾.

Sabe-se que exercícios de intensidade mais alta resultam em maiores incrementos na atividade de biomarcadores hormonais de estresse que respondem ao esforço como ACTH, cortisol e catecolaminas. O aumento da atividade desses hormônios não somente influencia o metabolismo, mas também os sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo e renal⁽⁴⁻⁵⁾. Tratando-se de exercícios prolongados, ocorre elevação dos hormônios que sustentam a disponibilidade dos substratos energéticos, incluindo cortisol, hormônio do crescimento (GH), glucagon e as catecolaminas^(2,6-7). Essas alterações são importantes para garantir bom desempenho no exercício.

Por outro lado, períodos prolongados de atividade elevada de glicocorticóides (no homem, fundamentalmente, o cortisol e, na

1. Departamento de Educação Física, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro, São Paulo, Brasil.

2. Faculdades Integradas Einstein de Limeira.

Aceito em 23/10/06.

Endereço para correspondência: Maria Alice Rostom de Mello, Av. 24A, 1.515, Departamento de Educação Física, IB, UNESP – 13506-900 – Rio Claro, SP, Brasil. Tel.: (19) 3526-4320, fax: (19) 3526-0009. E-mail: mellomar@rc.unesp.br

maioria dos roedores, a corticosterona) podem desencadear respostas indesejáveis ao organismo, como: resistência à insulina, supressão do sistema imunológico e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)^(3,8-10) bem como o aumento na incidência de doenças cardiovasculares⁽¹¹⁻¹³⁾.

No músculo esquelético, a corticosterona age diretamente promovendo a degradação protéica, principalmente nos músculos brancos ricos em fibras glicolíticas. Essa rápida mobilização de aminoácidos a partir das reservas musculares torna-os disponíveis tanto como fonte energética quanto para a síntese de outros compostos^(3,14-15). Isso, embora útil na preservação da homeostase, implica prejuízo da função muscular. Dessa forma, o exercício agudo/crônico em modelos animais pode ocasionar altos níveis de estresse nos mesmos, podendo interferir nos resultados esperados do treinamento. Tal situação mostra a relevância da identificação do nível de estresse do animal durante o exercício.

A questão de como definir o bem-estar do animal e como avaliá-lo encontra-se em aberto. Um potente indicador do bem-estar é a ausência de estresse, mas a definição padrão de estresse é controversa e não existe na literatura um simples marcador bioquímico para mensurá-lo. A atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) está diretamente ligada às respostas fisiológicas do organismo ao estresse. Sabendo-se que o eixo HHA é formado pelos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, as concentrações séricas desses hormônios são consideradas importante indicador de estresse^(9,16). Conhecidamente, a síntese de corticosterona pelo córtex da adrenal é derivada da molécula de colesterol, em um processo de oxi-redução, onde há participação do ácido ascórbico. Portanto, outro indicador de estresse que pode ser utilizado é a depleção das concentrações de colesterol e ácido ascórbico na glândula adrenal⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Apesar de bem elucidada a participação dos biomarcadores citados anteriormente nas respostas ao estresse, até a presente data, faltam na literatura trabalhos preocupados em verificar se as respostas hormonais de ACTH e corticosterona e a depleção de ácido ascórbico e colesterol da adrenal teriam a mesma sensibilidade para detectar modificações discretas no nível de estresse imposto a ratos pelo exercício agudo de natação em intensidades conhecidas e distintas.

Já é bem conhecido no homem que a intensidade do exercício modifica condições de estresse, dentre outros aspectos, e essa condição resulta em distintas respostas fisiológicas frente ao esforço agudo ou crônico. Entretanto, raras são as pesquisas envolvendo animais que se preocupam em determinar com precisão as diferentes intensidades de esforço durante o exercício de natação e suas específicas respostas ao estresse.

Pensando na lacuna existente na literatura referente a protocolos de avaliação em animais, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo métodos para identificar de maneira precisa a intensidade individual de exercício para ratos submetidos a esforços em distintos ergômetros, adaptando à avaliação animal testes já aplicados a humanos⁽²⁰⁻²¹⁾. Tais pesquisas, no entanto, deixaram em aberto as específicas respostas ao estresse referente às diferentes intensidades de esforço.

O protocolo considerado *gold standard* para a identificação da transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante exercício tanto no homem como no animal é o de máxima fase estável de lactato (MFEL)⁽²⁰⁻²³⁾. A MFEL representa a intensidade mais elevada na qual ocorre estabilização do lactato sanguíneo durante exercício contínuo, devido ao equilíbrio entre a produção do lactato e a sua remoção da corrente sanguínea^(20-21,23-24).

Considerando a importância em avaliar o estresse de animais submetidos ao exercício e os possíveis efeitos da intensidade nessas respostas, o presente estudo teve dois objetivos. 1) Analisar a atividade do eixo HHA em diferentes intensidades. 2) Analisar qual o biomarcador (concentrações de ACTH e corticosterona no soro ou concentrações de ácido ascórbico e colesterol nas glândulas

adrenais) mais sensível para mensurar com mais exatidão o nível de estresse de ratos durante exercício agudo de natação em diferentes intensidades de esforço. As intensidades utilizadas no presente estudo foram: MFEL, interpretada como a máxima intensidade com predominância aeróbia e carga 25% superior a ela, considerada caracteristicamente anaeróbia.

MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos (n = 28), da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 60 dias de idade no início do experimento. Os animais, provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP – Campus de Rio Claro, em gaiolas coletivas (cinco ratos por gaiola), à temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo claro (início 7:00h)/escuro (início 19:00h) de 12/12 horas, e com livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada padrão – *Purina*). Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as resoluções brasileiras específicas sob a Bioética em Experimentos com Animais (Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934).

Delineamento e grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em três grupos, em função da condição de sacrifício (intensidade do exercício agudo) em:

- **Máxima fase estável de lactato na natação (M):** constituído por ratos (n = 9) que foram selecionados aleatoriamente depois de adaptados à natação e efetuado o teste individual de máxima fase estável de lactato. Os animais pertencentes a este grupo foram sacrificados imediatamente após 25 minutos de exercício contínuo em intensidade de máxima fase estável de lactato.

- **Superior à intensidade de máxima fase estável de lactato na natação (S):** constituído por ratos (n = 9) que foram selecionados aleatoriamente depois de adaptados à natação e efetuado o teste individual de máxima fase estável de lactato. Os animais pertencentes a este grupo foram sacrificados imediatamente após exercício exaustivo em intensidade 25% superior à máxima fase estável de lactato.

- **Controle (C):** composto por ratos (n = 10) que foram adaptados ao meio líquido e sacrificados em repouso.

Adaptação ao exercício de natação

A adaptação foi realizada em um tanque cilíndrico de 120cm de profundidade x 80cm de diâmetro, com temperatura da água 31 ± 1°C. Consistiu de esforços diários de natação, cinco dias/semana, durante três semanas, com sobrecargas de 0; 1 e 2% do peso corporal e duração de 1-5 min. O objetivo da adaptação foi familiarizar o rato ao meio líquido, ao incremento atado ao dorso e ao exercício propriamente dito sem promover alterações fisiológicas relativas ao treinamento físico⁽²⁰⁾.

Teste de máxima fase estável de lactato (MFEL) na natação

Depois de adaptados ao exercício, cada animal (n = 18) foi submetido a três testes de exercício com intensidades equivalentes a sobrecargas (peso de chumbo fixado no dorso do animal) de 5,0; 5,5 e 6,0% do peso corporal (PC). Os testes foram efetuados com 48 horas de intervalo entre eles, com a seqüência das intensidades (sobrecargas) distribuídas de maneira aleatória. Cada teste consistiu de 25 minutos contínuos de natação na intensidade estabelecida ou até a exaustão, sendo realizado por todos os 18 animais. Houve coleta de sangue através de pequeno corte na extremidade da cauda dos animais em repouso e a cada cinco minutos

de exercício durante o teste. A coleta de sangue foi efetuada em 30s, para evitar que a retirada do animal da água por tempo prolongado provocasse estresse adicional, interferindo na resposta ao exercício. A lactacidemia durante o teste foi considerada estável quando não houve diferença superior a 1mmol/L dos 10 aos 25 minutos de exercício.

Análise do lactato sanguíneo

As amostras de sangue (25µL) coletadas durante os testes foram depositadas em tubos de Eppendorf (1,5mL) contendo 50µL de fluoreto de sódio (1%). Armazenadas em freezer para posterior análise da concentração de lactato (YSI model 1500 SPORT).

Sacrifício dos animais

Após 48 horas do último teste de MFEL, os animais foram sacrificados por decapitação em condição de repouso ou imediatamente após sessão aguda de 25 minutos ou exaustiva de exercício (dependendo do grupo pertencente), sem jejum prévio, para coleta de sangue. Houve separação do soro por centrifugação, visando as dosagens imediatas de hormônio adrenocorticotrófico-ACTH (Kit Coat-A-Count da Diagnostic Products Corporation-DPC), hormônio corticosterona específico para ratos (Kit Coat-A-Count da Diagnostic Products Corporation-DPC) e para excisão das glândulas adrenais, para dosagens imediatas de ácido ascórbico (adrenal esquerda)²⁵⁾ e colesterol (adrenal direita), (Kit Labtest).

Análise estatística

Os procedimentos estatísticos incluíram análise de variância one-way (ANOVA) para amostras independentes, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS

A figura 1 apresenta os resultados referentes aos testes para identificação da máxima fase estável de lactato (MFEL) durante o exercício de natação. Durante esforços contínuos com sobrecargas de 5,0 e 5,5% do peso corporal (PC), observou-se estabilização da concentração de lactato sanguíneo dos 10 aos 25 minutos de exercício, nos valores médios de $5,1 \pm 0,3$ e $5,2 \pm 0,3$ mmol/L, respectivamente. Na sobrecarga de 6,0% do peso corporal, houve aumento progressivo da concentração de lactato sanguíneo. Dessa forma, a MFEL foi obtida na sobrecarga de 5,5% do PC.

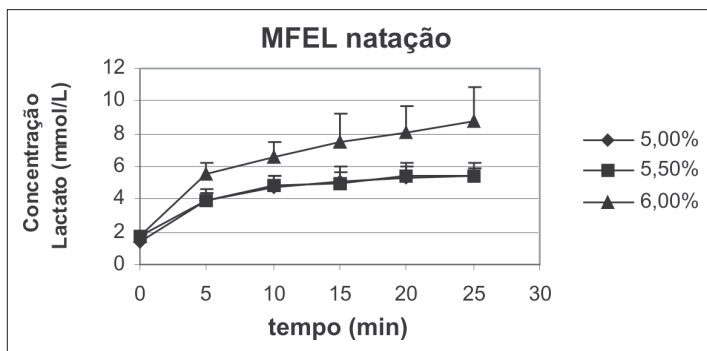


Figura 1 – Concentração de lactato sanguíneo (média ± DP) durante teste para identificação de máxima fase estável de lactato (MFEL) no exercício natação

Os resultados explicitados na figura 2 são referentes às concentrações séricas dos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) (A) e corticosterona (B) após o sacrifício dos animais. As concentrações séricas de ACTH encontradas nos grupos submetidos à natação (M = $963,37 \pm 420,47$ e S = $1284,44 \pm 361,36$ pg/mL) foram superiores quando comparadas com as concentrações dos animais do grupo controle (C = $179,32 \pm 46,31$ pg/mL). Quando comparados os grupos submetidos à natação, os animais pertencentes ao grupo S tiveram maiores valores de ACTH sérico que os dos animais do grupo M. Quanto ao hormônio corticosterona, o grupo S ($3.845,51 \pm 788,8$ ng/mL) mostrou maiores concentrações comparadas com as dos demais grupos (C = $467,11 \pm 262,12$ e M = $2661,26 \pm 627,89$ ng/mL). Também, o grupo M mostrou maiores valores, quando comparado com os valores do grupo controle C.

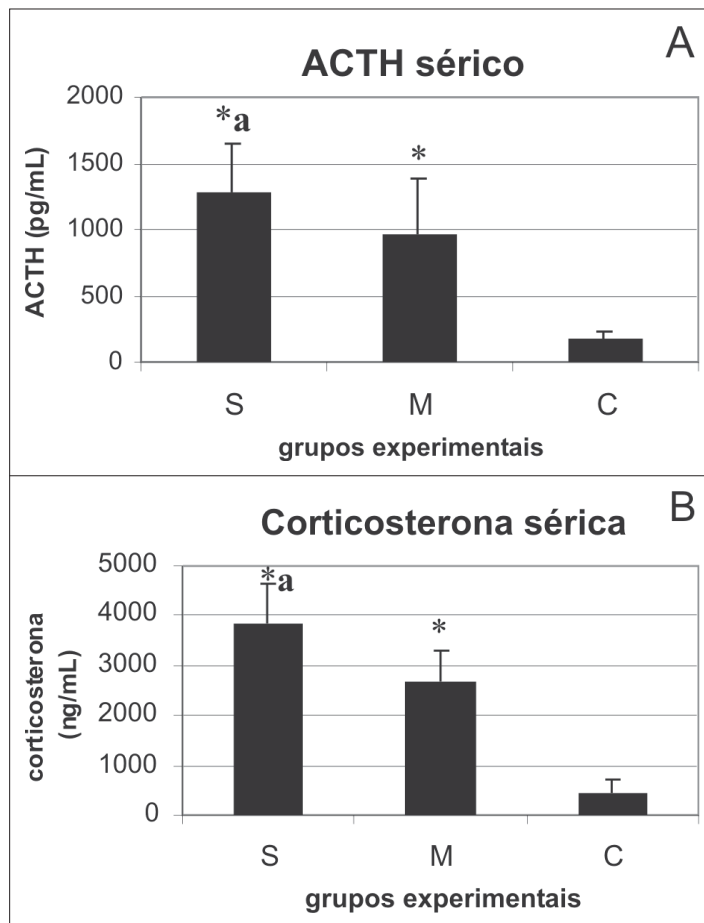


Figura 2 – Concentrações dos hormônios adrenocorticotrófico (pg/mL) (A) e corticosterona (ng/mL) (B) (média ± DP) dos animais ao final do experimento em repouso e após sessão de exercício em intensidade equivalente à máxima fase estável de lactato (MFEL) e 25% superior a esta no exercício natação. M = máxima fase estável de lactato-MFEL; s = 25% superior à MFEL e c = controle. *, $P < 0,05$ diferença em relação ao grupo controle; a $P < 0,05$ diferença em relação ao grupo M.

Os dados do ácido ascórbico e colesterol da glândula adrenal dos diferentes grupos após o sacrifício encontram-se nas figuras 3 (A) e (B), respectivamente. A análise dos resultados identificou concentrações maiores de ácido ascórbico no grupo controle (C = $2,54 \pm 0,53$ µg/mg) quando comparadas com as concentrações dos grupos submetidos à natação (M = $1,32 \pm 0,27$ e S = $1,28 \pm 0,46$ µg/mg). Os resultados da concentração de colesterol da glândula adrenal apresentaram padrão similar ao encontrado para a concentração de ácido ascórbico. O grupo controle (C = $1,15 \pm 0,4$ mg/100mg) apresentou valores mais elevados comparados a ambos os grupos submetidos ao exercício de natação (M = $0,37 \pm 0,09$ e S = $0,33 \pm 0,04$ mg/100mg). Não houve diferença nas concentrações de ácido ascórbico e colesterol da glândula adrenal quando comparadas as duas intensidades de exercício (M e S).

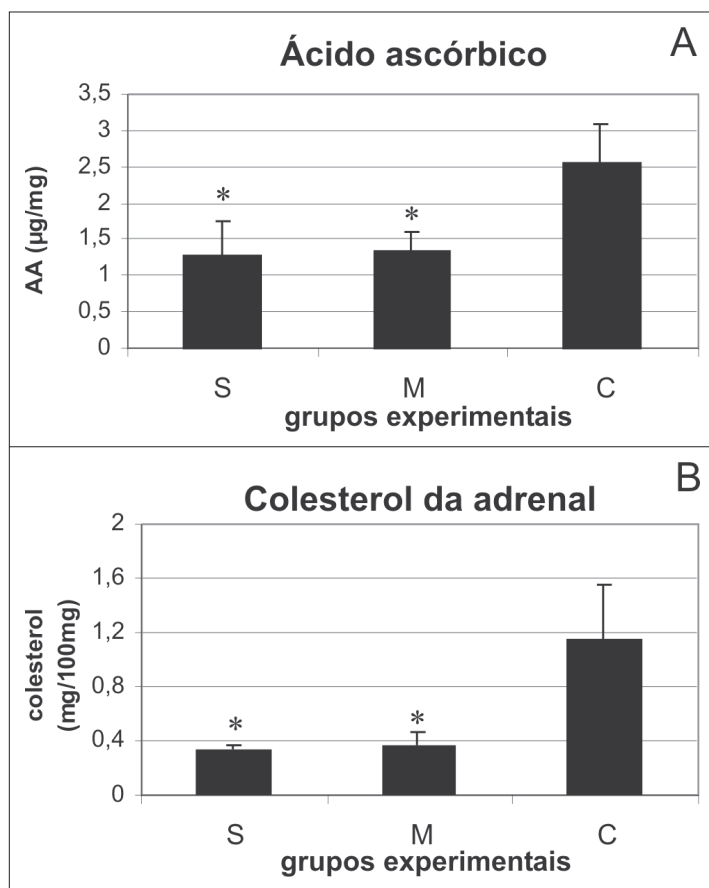


Figura 3 – Ácido ascórbico (µg/mg) (A) e colesterol da glândula adrenal (mg/100mg) (B) dos animais ao final do experimento em repouso e após 25 minutos de exercício em intensidade equivalente à máxima fase estável de lactato (MFEL) e 25% superior a esta no exercício natação. M = MFEL; S = 25% superior à MFEL e C = controle. *, P < 0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

O exercício acarreta aumentos ou reduções nas concentrações sanguíneas de alguns hormônios, em relação às concentrações de repouso, para que o organismo consiga suprir a maior demanda energética e manter a homeostase^(7,26). Com bastante frequência, as elevações ou reduções refletem diretamente ajustes no ritmo de secreção hormonal por parte de uma glândula endócrina^(4,27).

Grande número de estudos relata que exercícios de intensidade submáxima resultam em aumentos nos hormônios do estresse pertencentes ao eixo HHA, ACTH e corticosterona, sendo este último secretado pela glândula adrenal^(2,4). Durante a síntese de corticosterona pelo córtex da adrenal, ocorrem alterações bioquímicas nessas glândulas, como depleção das concentrações de colesterol e ácido ascórbico^(18,28-29). Um fator fundamental para o desenvolvimento bem-sucedido de pesquisas envolvendo animais e exercício físico é o bem-estar dos mesmos, e a ausência de estresse é um pré-requisito para essa situação. Por essa razão, o presente estudo objetivou analisar a atividade do eixo HHA e verificar qual o biomarcador (concentrações séricas hormonais – ACTH e corticosterona – ou concentrações bioquímicas das glândulas adrenais – ácido ascórbico e colesterol) mais sensível para mensurar com mais exatidão o nível de estresse de ratos durante exercício agudo de natação em intensidades de esforço distintas e conhecidas: MFEL e 25% superior a esta.

O procedimento considerado *gold standard* para a identificação da transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante exercício é o de máxima fase estável de lactato (MFEL), que representa a in-

tensidade mais elevada de exercício na qual ocorre equilíbrio entre a liberação e a remoção de lactato da corrente sanguínea⁽²⁴⁾. Em estudos anteriores nosso grupo demonstrou ser possível a determinação da MFEL em ratos⁽²⁰⁻²¹⁾.

A MFEL foi encontrada na concentração de $5,2 \pm 0,3$ mmol/L de lactato sanguíneo, à intensidade de 5,5% do peso corporal (PC). Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Gobatto *et al.*⁽²⁰⁾, que encontraram a MFEL de ratos sedentários na concentração média de 5,5mmol/L de lactato sanguíneo, à intensidade de 5-6% do PC. Entretanto, esses valores diferem dos encontrados por Manchado *et al.*⁽²¹⁾, que utilizaram o mesmo princípio de exercício com cargas contínuas no exercício de corrida em esteira rolante. Em corrida, a MFEL ocorreu na velocidade 20m/min, em concentração de lactato $3,9 \pm 0,3$ mmol/L. A diferença nas concentrações sanguíneas de lactato observadas entre o presente estudo e a pesquisa de Manchado *et al.*⁽²¹⁾ pode ser atribuída ao tipo de exercício empregado, ressaltando a ergômetro-dependência do teste de máxima fase estável de lactato aplicado a ratos, assim como o observado em humanos.

Após obtenção da MFEL, os animais foram submetidos a uma sessão de exercício de 25 minutos na intensidade MFEL ou sessão de exercício exaustivo na intensidade 25% superior à MFEL, na tentativa de explicitar que suaves alterações na carga atada ao dorso dos ratos podem implicar distintas respostas fisiológicas relacionadas ao estresse.

Embora há décadas já esteja bem estabelecido na literatura que o aumento na atividade do eixo HHA de humanos durante o exercício seja proporcional à intensidade do mesmo⁽³⁰⁻³³⁾, são raros os estudos com modelos animais que se preocupam com a identificação da intensidade de esforço utilizada em exercício agudo/crônico de maneira precisa e sua conseqüente resposta no eixo HHA. Além disso, até a presente data, faltam na literatura trabalhos associando a sensibilidade de diferentes biomarcadores de estresse durante exercício agudo de natação para ratos em distintas intensidades.

A realização do exercício de natação em ambas as intensidades (MFEL e 25% superior) implicou aumentos das concentrações de ACTH e corticosterona comparadas às dos animais em repouso. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Oliveira *et al.*⁽³⁴⁾ em estudos sobre o efeito agudo do exercício de natação em ratos, na atividade do eixo HHA. Em pesquisa realizada com ratos exercitados em esteira rolante, Kawashima *et al.*⁽³⁵⁾ encontraram resultados similares, tais como aumento nas concentrações dos hormônios corticosterona e ACTH. Cabe ressaltar que em ambos os estudos não houve a preocupação com a identificação precisa da intensidade do esforço dos animais.

Quando animais ou seres humanos são expostos a estímulos potencialmente nocivos (exercício, frio, privação de sono, imobilização, entre outros), ocorre aumento da ativação do eixo HHA, com secreção de ACTH e correspondente elevação da concentração circulante de glicocorticóides^(4,36-37). Esses aumentos são considerados a linha de frente dos mecanismos endócrinos para defender o organismo contra as condições de estresse, aumentando principalmente a oferta de substratos energéticos⁽⁹⁾. Os glicocorticóides são capazes de estimular a gliconeogênese pelo fígado, atuando diretamente na enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) ou indiretamente através da sensibilidade aumentada dos hormônios responsáveis pela glicólise hepática, adrenalina e glucagon⁽³⁸⁾. Contudo, excesso da ativação do eixo HHA e conseqüentes aumentos nas concentrações séricas de corticosterona podem levar à ruptura da homeostase e efeitos indesejáveis ao organismo^(3,34).

Os glicocorticóides são hormônios de ação antagonista à insulina, impedindo, assim, a ação anabólica desse hormônio. A resistência à insulina causada pelo excesso de glicocorticóides plasmáticos não somente pode desencadear o *diabetes mellitus* tipo 2 como também promover o catabolismo protéico das fibras musculares⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Quando comparadas com as concentrações hormonais nas duas intensidades selecionadas (MFEL x 25% superior a esta), foram constatados aumentos mais acentuados nas concentrações de ACTH e corticosterona em intensidade 25% superior à da MFEL. Segundo Soya⁽³⁴⁾, a atividade do eixo HHA durante exercício agudo depende da intensidade do mesmo, produzindo maior atividade em altas intensidades. Em exercícios realizados por humanos com consumo máximo de O₂ maior que 60% do $\dot{V}O_{2\text{max}}$, a secreção de ACTH e cortisol é proporcional à intensidade do exercício⁽⁴⁰⁾. Levando-se em consideração esse aspecto, os resultados de ACTH e corticosterona mostram que a atividade do eixo HHA no exercício agudo de natação em ratos é similar à dos seres humanos, com maiores concentrações em maiores intensidades.

Foram também avaliadas as concentrações de colesterol e ácido ascórbico na adrenal dos animais após a realização do exercício agudo de natação. Os valores de ácido ascórbico, bem como de colesterol na glândula adrenal, foram menores nos animais submetidos ao exercício de natação comparados com o repouso. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Kelliher *et al.*⁽⁴¹⁾ em estudo com animais exercitados por natação. Ao serem comparadas as concentrações de colesterol e ácido ascórbico na adrenal nas duas intensidades (MFEL x 25% superior a esta), não foi encontrada nenhuma diferença.

Todos os esteróides humanos assim como os dos ratos são sintetizados a partir da molécula de colesterol. O colesterol utilizado na síntese dos esteróides pode ser sintetizado pelas células do córtex através do acetato; entretanto, 80% são provenientes das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do plasma⁽⁴²⁾. Dessa forma, é possível que a maior síntese de corticosterona encontrada no grupo 25% superior à MFEL tenha sido sustentada pelo colesterol (LDL) plasmático.

Está bem claro que o ácido ascórbico é considerado um potente redutor fisiológico e está altamente concentrado nas glândulas adrenais. No córtex da adrenal, o aumento da síntese de corticosterona após estresse ou administração exógena de ACTH está geralmente associado a diminuição na concentração de ascorbato⁽¹⁸⁾. Entretanto, a participação deste último na esterogênese não está totalmente elucidada. Em estudos realizados com ratos mutantes incapazes de sintetizar o ácido ascórbico, Mitani *et al.*^(43,44) encontraram alterações nas concentrações de aldosterona sérica, sem alterações na concentração de corticosterona quando a oferta

de ácido ascórbico foi reduzida. Por outro lado, Bornstein *et al.*⁽⁴⁵⁾ e Patak *et al.*⁽⁴⁶⁾, encontraram reduções na concentração sérica de corticosterona em pesquisa realizada com ratos mutantes com ausência no transportador de membrana do ácido ascórbico (SVCT2).

Desse modo, as concentrações de colesterol e ácido ascórbico na glândula adrenal apresentaram reduções após exercício agudo de natação. Entretanto, não foram sensíveis as modificações referentes à intensidade.

Em resumo, os biomarcadores analisados (concentrações séricas de ACTH e corticosterona e concentrações de ácido ascórbico e colesterol da glândula adrenal) apontaram alterações no nível de estresse de ratos submetidos a exercício agudo de natação em intensidade de MFEL e 25% superior. As concentrações séricas hormonais mostraram-se mais sensíveis a pequenas alterações na intensidade do exercício. Portanto, esses biomarcadores parecem mais adequados para inferir, com maior exatidão, os níveis de estresse de ratos exercitados em natação. Mais estudos são necessários para relacionar o papel do ácido ascórbico da adrenal na esterogênese.

Uma vez que a atividade do eixo HHA de ratos mostrou relação direta com a intensidade do exercício, nossos resultados apontam a necessidade de cautela na prescrição de exercício físico para ratos, já que pequenas alterações na intensidade de esforço, especialmente acima da transição metabólica aeróbia/anaeróbia, acarretam modificações nos biomarcadores hormonais de estresse, que sabidamente podem influenciar as respostas fisiológicas específicas do exercício. Para a precisa determinação da carga de esforço de acordo com os objetivos pretendidos, sugerimos a utilização do protocolo de máxima fase estável de lactato, considerado padrão ouro para essa obtenção.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi suportado pelos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESP. Agradecemos ao apoio técnico de José Roberto Rodrigues da Silva, Eduardo Custódio e a Clarice Yoshiko Sibuya.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Filaire E, Duche P, Lac G, Robert A. Saliva cortisol, physical exercise and training: influences of swimming and handball on cortisol concentrations in women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996;74(3):274-8.
2. Inder WJ, Hellemans J, Swanney MP, Prickett TC, Donald RA. Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH and AVP in male athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30(3):835-41.
3. Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(6):791-7.
4. Smilios I, Piliandis T, Karamouzis M, Tokmakidis SP. Hormonal responses after various resistance exercise protocols. *Med Sci Sports Exerc*. 2002;35(4):644-54.
5. Durand RJ, Castracane VD, Hollander DB, Tryniecki JL, Bamman MM, O'Neal S, et al. Hormonal responses from concentric and eccentric muscle concentrations. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(6):937-43.
6. Koivisto VA, Soman VR, Feliq P. Effects of acute exercise and training on insulin binding to monocytes and insulin sensitivity in vivo. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1980;283:70-8.
7. Dishman RK, Renner K J, White-Welkley JE, Burke KA, Bunnell BN. Treadmill exercise training augments brain norepinephrine response to familiar and novel stress. *Brain Res Bull*. 2000;52:337-42.
8. Dallman MF. Stress update: adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends End Metabol*. 1993;4:62-9.
9. Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23:67-74.
10. Visser MJ, Van der Veer E, Postma DS, Arends LR, De Vries TW, Brand PL. Side-effects of fluticasone in asthmatic children: no effects after dose reduction. *Eur Respir J*. 2004;24:420-5.
11. Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact*. 1996;102:17-36.
12. Fauvel JP. Stress mental et système cardiovasculaire. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2002;51:76-80.
13. Ramey SL. Cardiovascular disease risk factors and the perception of general health among male law enforcement officers: encouraging behavioral change. *AAOHN J*. 2003;51(5):219-26.
14. Kettelhut IC, Wing SS, Goldberg AL. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab Rev*. 1988;4:751-72.
15. Xavier AR, Roselino JES, Resano NMZ, Garófalo MAR, Migliorini RH, Kettelhut IC. Glyconeogenic pathway in isolated skeletal muscles of rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80:162-7.
16. Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med*. 1995;20(4):251-76.
17. Arad I, Sidi A, Shohami E. Effect of acute hypoxia on ascorbate content of plasma, cerebral cortex, and adrenal gland. *J Neurochem*. 1985;45(3):766-9.
18. Rotta MA. [Utilization of the ascorbic acid (Vitamin C) for fish]. *Embrapa Pantanal, Corumbá*; 2003.
19. Pfanzagl B. Ascorbate is particularly effective against LDL oxidation in the presence of iron (III) and homocysteine/cystine at acid pH. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1736(3):237-47.
20. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;130(1):21-7.
21. Manchado FB, Gobatto CA, Contartezze RVL, Papoti M, Mello MAR. Maximal lactate steady state in running rats. *J E P online*. 2005;8:29-35.

22. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. *Int J Sports Med.* 1985;16(3):117-30.
23. Beneke R. Maximal lactate steady state concentration (MLSS): experimental and modelling approaches. *Eur J Appl Physiol.* 2003;88(4-5):361-9.
24. Mader A, Heck H. A theory of the metabolic origin of "anaerobic/threshold". *Int J Sports Med.* 1986;7(Suppl 1):45-65.
25. Midlin RL, Butler AM. The determination of ascorbic acid in plasma. A micro-method. *J of Biol Chem.* 1938;122:673-86.
26. Lampman RM, Schteingart DE. Effects of exercise training on glucose control, lipid metabolism, and insulin sensitivity in hypertriglyceridemia and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(6):703-12.
27. Kirwan JP, del Aguila LF, Hernández JM, Williamson DL, O'Gorman DJ, Lewis R, et al. Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1 associated PI3-kinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2000;88(2):797-803.
28. Orth DN, Kovacs WJ, DeBold R. The adrenal cortex. In: Wilson JD, Foster DW. *Williams textbook of endocrinology.* 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1992.
29. Pignatelli D, Magalhaes MM, Magalhaes MC. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res.* 1998;30:464-74.
30. Raymond LW, Sode J, Tucci JR. Adrenocortical response to non-exhaustive muscular exercise. *Acta Endocrinol.* 1972;70(1):73-80.
31. Davies CT, Few JD. Adrenocortical activity in exercise. *J Physiol.* 1971;213(2):35P-36P.
32. Bellet S, Roman L, Barham F. Effect of physical exercise on adrenocortical excretion. *Metabolism.* 1969;18(6):484-7.
33. Sutton JR, Young JD, Lazarus L, Hickie JB, Maksvytis J. The hormonal response to physical exercise. *Australas Ann Med.* 1969;18(2):84-90.
34. De Oliveira CA, Suchecki D, Cohen S, D'Almeida V. Acute stressor-selective effect on total plasma homocysteine concentration in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;77:269-73.
35. Kawashima H, Saito T, Yoshizato H, Fujikawa T, Sato Y, McEwen BS, et al. Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running according to its period. *Life Sci.* 2004;76(7):763-74.
36. Natelson BH, Tapp WN, Adamus JE, Mittler JC, Levin BE. Humoral indices of stress in rats. *Physiol Behav.* 1981;26(6):1049-54.
37. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002;53(4):865-71.
38. Allan EH, Titheradge MA. Effects of treatment of rats with dexamethasone in vivo on gluconeogenesis and metabolite compartmentation in subsequently isolated hepatocytes. *Biochem J.* 1984;219:117-23.
39. Soya H. Stress response to exercise and its hypothalamic regulation: possible role of arginine-vasopressin. In: Nose H, editor. *Exercise, nutrition and environmental stress.* Traverse City; I.L. Cooper, 2001. p. 21-37.
40. Howlett TA. Hormonal responses to exercise and training: a short review. *Clin Endocrinol.* 1987;26(6):723-42.
41. Kelliher P, Connor TJ, Harkin A, Sanchez C, Kelly JP, Leonard BE. Varying response to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. *Physiol Behav.* 2000;69:4-5.
42. Mello MP, Penachioni JY, Amaral FC, Castro M. Deficiência da 11-hidroxilase. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(5):713-23.
43. Mitani F, Ogishima T, Mukai K, Hoshino R, Watanabe K, Suematsu M. Possible participation of outer mitochondrial membrane cytochrome B5 in steroidogenesis in zone glomerulosa of rat adrenal cortex. *Endocr Res.* 2004;30(4):639-44.
44. Mitani F, Ogishima T, Mukai K, Suematsu M. Ascorbate stimulates monooxygenase-dependent steroidogenesis in adrenal zone glomerulosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):483-90.
45. Bornstein SR, Yoshida-Hiroi M, Sotiriou S, Levine M, Hartwig HG, Nussbaum RL, et al. Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of ascorbic acid transporter (SVCT2). *FASEB J.* 2003;17(13):1928-30.
46. Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR. Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and medulla. *Endocr Res.* 2004;30(4):871-5.