

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA - UNIMEP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FACIS**

**PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**O efeito do cipionato de estradiol na limitação funcional induzida pela  
desnervação neuromuscular e ovariectomia em ratas**

**Maria Theresa Munhoz Severi**

**2006**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

MARIA THERESA MUNHOZ SEVERI

O EFEITO DO CIPIONATO DE ESTRADIOL NA LIMITAÇÃO FUNCIONAL  
INDUZIDA PELA DESNERVAÇÃO NEUROMUSCULAR E  
OVARIECTOMIA EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de Concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de Pesquisa: Intervenção Fisioterapêutica no Sistema Neuromuscular.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA  
2006

### **Ficha Catalográfica**

Severi, Maria Theresa Munhoz.

O efeito do cipionato de estradiol na limitação funcional induzida pela desnervação neuromuscular e ovariectomia em ratas. Piracicaba, 2006.  
p.122

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Silva.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia,  
Universidade Metodista de Piracicaba.

1. estrógeno 2. ovariectomia 3. desnervação 4. músculo 5. fisioterapia

I. Silva, Carlos Alberto. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa  
de Pós-graduação em Fisioterapia. III Título.

A Deus, por me dar a vida e recheá-la com pessoas especiais e momentos inesquecíveis.

Aos meus pais que me proporcionaram uma educação acreditando que o investimento profissional é o maior patrimônio.

Aos meus filhos que com amor, carinho e compreensão me retribuíram em momentos de ausência. **Dedico!**

## AGRADECIMENTO

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indiretamente de muitas pessoas, especialmente:

Ao Professor **Carlos**, por acreditar em meu potencial e ser um incentivador incansável da pesquisa científica e captação dos docentes de fisioterapia, indo além da teoria, da técnica... Mas, ensinando a pensar, a ter idéias inovadoras e a olhar para as coisas de modo diferenciado. Tenho que agradecer seu amor pelo ensino, sabedoria, lágrimas, criatividade, perspicácia dentro e fora da sala de aula. Meu agradecimento e profundo respeito ainda são pouco diante de tudo que me foi oferecido.

À professora **Maria Luiza** pela disponibilidade em ensinar e contribuir.

Aos **membros da banca** por estarem sempre dispostos a contribuir com suas considerações, correções e sugestões que são de extrema importância para o enriquecimento deste trabalho.

Ao **grupo de estudo** do Prof<sup>o</sup> Carlos: Karina, Luciano, Gabriel, Rommel, Paula e João pelas horas de estudo, debates, idéias, contribuições e também pelas horas de conversa à toa, brincadeiras, gargalhadas... Obrigada pelo acolhimento, amizade e ajuda. Mais do que colegas vocês foram verdadeiros amigos. Sem vocês com certeza este caminho seria mais difícil.

Em especial à **Karina**, pela sua ajuda, sempre foi incansável e sua contribuição incalculável.

Às técnicas de Laboratório de Fisiologia: **Patrícia e Melissa** pela extensa ajuda na fase experimental deste trabalho.

Ao **Ben Hur**, por incentivar a estar sempre ultrapassando limites. É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida mais interessante.

A todos os **voluntários** que indiretamente contribuíram com estímulo e inspiração neste estudo, em especial as pacientes da Terceira Idade da **Clínica Reviva**.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

## Desejo que você

Não tenha medo da vida, tenha medo de não vive-la.  
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.

Só é digno de pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.

Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.

Os frágeis usam força; os fortes a inteligência.

Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina.

Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.

Uma mente saudável deveria ser uma usina de sonhos.

Pois sonhos oxigenam a inteligência e irrigam a vida de prazer e sentido.

Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama.

Augusto Cury

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação estrogênica sobre o perfil metabólico e morfológico muscular, além da sensibilidade tecidual periférica de ratas submetidas à ovariectomia e desnervação muscular. Os animais foram divididos em 11 grupos experimentais (n=6): controle (C), tratado com estradiol 7 (E7) e 15 dias (E15), ovariectomizado 7 (O7) e 15 dias (O15), ovariectomizado tratado com estradiol 7 (OE7) e 15 dias (OE15), desnervado 7 (D7) e 15 dias (D15), desnervado tratado com estradiol 7 (DE7) e 15 dias (DE15). As análises realizadas foram: glicogênio (G) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV), peso corporal, do S e do útero, teste de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT), ciclo estral, índice de ingesta e análise morfométrica do S. A análise estatística incluiu o teste Kolmogorov-Smirnov, ANOVA e teste *post-hoc* de Tukey para comparar mais de 3 grupos e teste t para 2 grupos, e para a análise morfométrica, o teste Kruskal-Wallis e Tukey HSD pelos softwares Origin 6.0<sup>®</sup> e Prism<sup>®</sup> 3.0 (p<0,05). A análise do ciclo estral mostrou que os grupos O7 e O15 tiveram redução da permanência da fase proestro e os grupos OE7 e OE15 um aumento nessa fase. Os resultados relacionados ao GTT e ITT mostraram diferença significativa somente nos grupos O15 e OE15. O G dos músculos S, GB e GV diminuiu significativamente no grupo O15 e aumentou nos grupos E7, E15, OE15, porém o grupo OE7 apresentou aumento somente no S. Com relação à desnervação, somente o grupo D7 apresentou redução no G do S, porém os grupos DE7 e DE15 apresentaram aumento em todos os músculos quando comparados aos D7 e D15, respectivamente. Os grupos E7 e O7 não apresentaram alteração na área da fibra do sóleo, porém foi observado um aumento significativo na densidade da área do tecido conjuntivo. O grupo OE7 apresentou redução do tecido conjuntivo, quando comparado ao O7. Na condição D7, houve redução na área da fibra bem como aumento na densidade de área do tecido conjuntivo, no entanto, o grupo DE7, apresentou redução na proliferação do tecido conjuntivo quando comparado ao D7. Estes resultados sugerem que o estrógeno pode ser um recurso eficiente para minimizar tanto o comprometimento metabólico muscular, caracterizado pela atrofia muscular decorrente da desnervação, quanto em condições de deficiência hormonal, como foi demonstrada na ovariectomia.

**Palavras-chave:** estrógeno – ovariectomia – desnervação – músculo - fisioterapia

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the estrogen action on the metabolic and morphologic muscle profiles, besides the periphery tissue sensibility in female rats submitted to ovariectomy and muscle denervation. The animals were divided in 11 experimental groups (n=6): control (C), treated with estradiol for 7 (E7) and 15 days (E15), ovariectomized for 7 (O7) and 15 days (O15), ovariectomized treated with estradiol for 7 (OE7) and 15 days (OE15), denervated 7 (DE) and 15 days (D15), denervated treated with estradiol for 7 (DE7) and 15 days (DE15). The following analyses were carried out: glycogen amount in soleus (S), white (WG) and red gastrocnemius (RG), body, soleus and uterus weights, glycaemia, glucose (GTT) and insulin tolerance tests (ITT), estral cycle, solid and liquid intake and soleus morphometric analysis. The statistical analysis included the Kolmogorov-Smirnov test, ANOVA and *post-hoc* Tukey test to compare more of three groups and t test for 2 groups, and, for the morphometric analysis, the Kruskal-Wallis and Tukey HSD tests by Origin 6.0<sup>®</sup> and Prism<sup>®</sup> 3.0softwares (p<0.05). The estral cycle analysis showed that the O7 and O15 groups presented a reduced permanence time of the proestrus phase, while the OE7 and OE15 groups presented an increase in this phase. The GTT and ITT tests showed a significant difference only in the O15 and OE15 groups. Glycogen contents in the S, WG and RG muscles were reduced in the O15 group and enhanced in the E7, E15, OE15 groups, while in the OE7 group, the glycogen content increased only in the soleus muscle. As for denervation, only the D7 group showed reduced glycogen content in soleus, however, the DE7 and DE15 groups showed increased glycogen content in all muscles, when compared to the D7 and D15 groups, respectively. The OE7 group shows reduction in conjunctive tissue when compared to O7. In D7 condition, there was reduction in the fiber area and increase in the density of conjunctive tissue, however, the DE7 group shows reduction in conjunctive tissue proliferation when compared to D7. These results suggest that estrogen may be an effective resource to minimize as much muscle metabolic compromising, characterized to muscle atrophy by denervation, as in condition of hormonal deficiency, as it was demonstrated in ovariectomy.

**Key-words:** estrogen – ovariectomy – denervation – muscle - physiotherapy



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ : alfa

$\beta$ : beta

$\gamma$ : gama

$\mu$ : micro

$\beta$ -HADH:  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deidrogenase

AchE = acetilcolinesterases específicas

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico

ADP: difosfato de adenosina

AF: função ativadora

ATP: trifosfato de adenosina

cDNA: DNA complementar

CRH: hormônio liberador de corticotropina

DNA: ácido desoxiribonucléico

ERs: receptor de estrógenos

GH: hormônio do crescimento

GLUT: transportador de glicose

GS: glicogênio sintetase

GSK-3: glicogênio sintetase kinase-3

GTT = teste de tolerância à glicose

HPS: heat-shock protein

IGF: fator similar à insulina

IL= interleucina

IR = receptor de insulina

IRS = substrato do receptor de insulina

ITT = teste de tolerância à insulina

JNM = junção neuromuscular

Kg = quilograma

$K_{ATP}$  = canal de potássio sensível ao ATP

$K_{ITT}$  = velocidade de decaimento da glicose

LBD: domínio de ligação do ligante

MAPK = proteína quinase ativada por mitogen

mg = miligrama

mL = mililitro

mM (mmol) = milimolar

MMPS = metaloproteinases

nm = nanômetro

NFkB = fator nuclear kappa B

PPAR $\gamma$  = *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*

PDK = proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos

PGC-1  $\alpha$  = coativador

PEPCK = enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PH = *pleckstrin homology*

PI3-K: fosfatidilinositol-3-kinase

PKB = proteína quinase B

PP-1G: proteínas-ligantes-fosfatases-1

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

rpm = rotação por minuto

TIMPs = inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF -  $\alpha$  = fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRH = terapia de reposição hormonal

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão das ratas em grupos experimentais (n=6). Página 39.

Tabela 2. Porcentagem (%) de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7), ovariectomizado 7 dias (O7), e ovariectomizado tratado com estrógeno no período de 7 dias (OE7), n=6. Página 51.

Tabela 3. Dias de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7), ovariectomizado (O7) e ovariectomizado tratado com estrógeno (OE7) no período de 7 dias, n=6. Página 51.

Tabela 4. Caracterização da permanência em cada fase do ciclo estral representada pelo proestro (**P**), metaestro (**M**), diestro (**D**) e estro (**E**) dos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7), ovariectomizado (O7) e ovariectomizado tratado com estrógeno (OE7) no período de 7 dias. n=6, sendo que cada letra representa 0,5 dia. Página 51.

Tabela 5. Porcentagem (%) de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7), ovariectomizado (O15), tratado com estrógeno (E15) e ovariectomizado tratado com estrógeno (OE15) no período de 15 dias, n=6. Página 52.

Tabela 6. Dias de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estrógeno (E15), ovariectomizado (O15) e ovariectomizado tratado com estrógeno (OE15), n=6. Página 53.

Tabela 7. Caracterização da permanência em cada fase do ciclo estral representada pelo proestro (**P**), metaestro (**M**), diestro (**D**) e estro (**E**) dos grupos controle (C), tratado com estrógeno 15 dias (E15), ovariectomizado 15 dias (O15) e ovariectomizado tratado com estrógeno (OE15) no período de 15 dias. n=6, sendo que cada letra representa 0,5 dia. Página 53.

Tabela 8. Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) dos grupos controle (C), ovariectomizado 7 dias (O7), ovariectomizado 15 dias (O15), tratado com estrógeno 7 dias (E7), tratado com estrógeno 15 dias (E15), ovariectomizado tratado com estrógeno 7 dias (OE7) e ovariectomizado tratado com estrógeno 15 dias (OE15). n=6. Página 69.

Tabela 9. Peso muscular (mg) do sóleo dos grupos Controle, Desnervado 7 dias, desnervado 15 dias, Desnervado tratado com estrógeno 7 dias e Desnervado tratado com estrógeno 15 dias. n=6. Página 75.

Tabela 10. Valor da média $\pm$ dpm da área da fibra ( $\mu^2$ ) e da densidade de área do tecido conjuntivo (%) dos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7), ovariectomizado 7 dias (O7), ovariectomizado tratado com estrógeno 7 dias (OE7), desnervado 7 dias (D7) e desnervado tratado com estrógeno 7 dias (DE7). n=6. Página 76.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento cirúrgico da ovariectomia. Figura A: rata anestesiada e exposição do útero e ovários; B: posicionamento dos ovários; C: ligadura realizada no ovário; D: ovários retirados; E: ovários; F: incisão suturada. Página: 41.

Figura 2. Procedimento cirúrgico da desnervação. Figura A: exposição do membro posterior tricotomizado; B: incisão para localização da inervação; C: nervo isquiático isolado; D: nervo isquiático em destaque; E: comprimento do nervo seccionado; F: incisão suturada. Página: 43.

Figura 3. Procedimento de coleta do material para a determinação do ciclo estral. Página: 47.

Figura 4. Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (C), Ovariectomizado 7 dias (O7) e Ovariectomizado 15 dias (O15) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B).  $n=6$ ,  $p<0,05$ , \* comparado ao controle e # comparado ao Ovariectomizada 7 dias. Página: 57.

Figura 5. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (C), Ovariectomizado 7 dias (O7) e Ovariectomizado 15 dias (O15) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90. Página: 58.

Figura 6. Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7) e tratado com estrógeno 15 dias (E15) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B).  $n=6$ ,  $p<0,05$ , \* comparado ao controle e # comparado ao tratado com estrógeno 7 dias. Página: 60.

Figura 7. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7) e tratado com estrógeno 15 dias (O15)

representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90, n=6. Página: 61.

Figura 8. Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 7 dias (O7) e ovariectomizado tratado com estrógeno 7 dias (OE7) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B). n=6, p<0,05, \* comparado ao controle e # comparado ao ovariectomizado 7 dias. Página: 63.

Figura 9. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 7 dias (O7) e ovariectomizado tratado com estrógeno 7 dias (OE7) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90. n=6. Página: 64.

Figura 10. Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 15 dias (O15) e ovariectomizado tratado com estrógeno 15 dias (OE15) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B). n=6, p<0,05, \* comparado ao controle e # comparado ao ovariectomizado 15 dias. Página: 66.

Figura 11. Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 15 dias (O15) e ovariectomizado tratado com estrógeno 15 dias (OE15) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90. Página: 67.

Figura 12. Teste de tolerância à insulina (1U/kg) dos grupos (n=6) controle, desnervado 7 dias (D7) e desnervado tratado com estrógeno 7 dias (DE7). Página: 70.

Figura 13. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado. Página: 72.

Figura 14. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção branca (GB) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado. Página: 73.

Figura 15. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção vermelha (GV) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado. Página: 74.

Figura 16. Corte histológico do músculo sóleo dos grupos controle (A), tratado com estradiol (B), ovariectomizado (C), ovariectomizado com estradiol (D),desnervado (E), desnervado com estradiol (F). Observe aumento de tecido conjuntivo em B,C e E (seta) quando comparado ao A e redução em D e F quando comparado à respectiva condição (C e E, respectivamente). Coloração Hematoxilina-Eosina, 100x. Página: 77.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Metabolismo muscular esquelético e sinalização da insulina .....	21
2.2 Desnervação.....	26
2.3 Ciclo estral e Estradiol.....	28
2.4 Ovariectomia.....	33
3 OBJETIVO .....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1 Animais .....	38
4.2 Grupos Experimentais .....	38
4.3 Procedimentos .....	39
4.3.1 Tratamento com estradiol .....	39
4.3.2 Ovariectomia.....	40
4.3.3 Desnervação .....	42
4.4.Amostragem .....	44
4.5. Avaliação diária de ingestão (água e ração) e peso corporal .....	44
4.6. Determinação do glicogênio muscular.....	44
4.7. Teste de tolerância à insulina (ITT).....	45
4.8. Teste de tolerância à glicose (GTT).....	45
4.9. Determinação das fases do ciclo estral.....	46
4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA .....	47



4.10.1. Processamento das amostras do tecido muscular .....	47
4.10.2. Análise da área das fibras musculares .....	48
4.10.3. Análise do tecido conjuntivo intramuscular .....	48
4.11. Análise Estatística .....	49
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1 Ciclo Estral .....	50
5.2 Ovariectomia e tratamento com estradiol .....	53
5.3 Responsividade do pâncreas e do tecido muscular em animais ovariectomizados e sob tratamento com estradiol .....	55
5.4 Efeito da ovariectomia e do tratamento com estradiol no perfil glicogênico muscular e sobre o peso do músculo sóleo .....	67
5.5 Desnervação .....	69
5.6 Análise morfométrica do músculo sóleo .....	75
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
6.1 Ciclo Estral .....	78
6.2 Modulação da sensibilidade à insulina pelo estradiol .....	84
6.3 Relação entre conteúdo glicogênico, ovariectomia e estradiol .....	86
6.4 Relações funcionais entre desnervação neuromuscular e o estradiol .....	91
6.5 O efeito do estradiol, da ovariectomia e da desnervação sobre a análise morfométrica do músculo sóleo .....	96
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>114</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Na construção e desenvolvimento do projeto que culminou com esta dissertação procurou-se ir ao encontro de contemplar e interligar duas importantes vertentes que balizam ações profissionais e acadêmico-pedagógicas que norteiam a vida da autora.

Atualmente, a menopausa e a reposição hormonal são fatos bastante discutidos na literatura, devido a vários sistemas do organismo sofrerem influência do hormônio estrógeno, destacando o sistema músculo-esquelético que é o foco do nosso estudo.

Além da abordagem atual ser difundida nos meios científicos, em especial na área médica, a fisioterapia também é uma área que trabalha com reabilitação, prevenção de doenças, qualidade de vida e manutenção da saúde em mulheres de todas as faixas etárias, principalmente mulheres idosas que, estando na fase de menopausa, sofrem alterações hormonais importantes resultando em sintomas, como quadro de alterações de humor, perda de massa óssea e muscular. Estas alterações são queixas comuns na prática clínica em tratamento para problemas em coluna, joelhos, pós-operatório de fraturas, ressaltando que, as pacientes com alterações de humor como depressão e ansiedade, sentem-se desmotivadas à prática de atividade física, tornando-se cada vez mais sedentárias, condição que quando associada à perda hormonal, potencializa os efeitos degenerativos da terceira idade.

Na vertente ligada à atividade profissional fisioterapêutica, destacamos as atividades desenvolvidas na Clínica Reviva, situada na cidade de Piracicaba, que sob orientação da autora desta dissertação, atende 60

mulheres idosas que participam de um programa específico para a terceira idade, com a coordenação de fisioterapeutas, desenvolvida por educadores físicos, além da contribuição de médicos, psicólogos e nutricionistas. O programa oferece algumas modalidades como Ginástica, Dança, Ioga, Alongamento Terapêutico, e opções de horários para a prática de aulas no período da manhã, tarde ou noite. A paciente inicia um programa preventivo ou, após o término de um tratamento fisioterapêutico, realiza uma avaliação e responde a um questionário de cronobiologia (Horne e Ostberg, 1976) onde, de acordo com a pontuação, determinamos se o indivíduo é potencialmente matutino ou vespertino, e de acordo com o resultado, encaminhamos a paciente para o horário mais adequado de acordo com seu ritmo cronobiológico. Desta forma, a Clínica Reviva oferece modalidades e horários diferenciados para que o idoso tenha opção de escolher seu horário e a atividade que tenha maior afinidade, visando assim um melhor rendimento. As aulas são realizadas de duas a três vezes por semana com duração de uma hora por sessão, onde são realizados exercícios de fortalecimento, propriocepção, alongamento, relaxamento, coordenação motora e equilíbrio, objetivando auxiliar o idoso a minimizar os sintomas presentes no processo de envelhecimento associado às alterações hormonais, sempre em busca da melhora na qualidade de vida.

No que tange à vertente científico-pedagógica, destacamos que estudos pré-clínicos constituem passos essenciais para o direcionamento de ensaios clínicos em humanos e necessitam de reavaliações freqüentes visando à adequação experimental e o conhecimento de sua aplicabilidade. Neste contexto, desenvolver estudos experimentais com animais dotados de ciclos

endócrinos que reproduzam estados de hipofunção gonadal, implica num processo de reengenharia que permita a análise cuidadosa dos dados, mesmo sabendo-se que existe uma semelhança filogenética do rato com o ser humano. Com relação ao endocrinismo dos ratos, seu ciclo endócrino reprodutivo provém da atividade do eixo hipotálamo/ovariano, onde as gônadas secretam hormônios estruturadores do corpo como o estrógeno, progesterona e análogos a partir de uma programação biológica prévia, sobretudo dos chamado tecido-alvo como ossos, artérias, veias, vísceras, órgãos sexuais, mucosas, pele e tecido muscular, nos quais a homeostasia depende da integridade do sistema endócrino.

O estrógeno é um esteróide sexual próprio das fêmeas, derivado do carbono 18 e responsável pela homeostasia estrutural de muitos órgãos do corpo. Desde a década de 30, foi adotado o termo estrógeno para designar toda substância que é capaz de provocar modificações típicas do estro (aumento do útero e cornificação do epitélio vaginal) e induzir acasalamento, eventos observados em diversas condições experimentais e que se assemelham *in anima nobili*. Por fim, é notório que métodos indutores de hipoestrogenismo desencadeiam expressiva alterações na homeostasia das fibras musculares.

Este fato levou a direcionar o estudo para ratas sob a condição de ovariectomia, que é um método de hipoestrogenismo submetendo-as ou não ao tratamento com estrógeno, correlacionando assim, com as mulheres em condição de menopausa que recebem ou não o tratamento de reposição hormonal e seu efeito em um processo de reabilitação ou mesmo em períodos de desuso muscular.

Embora sejam conhecidos todos os efeitos benéficos do estrógeno como o de reduzir os efeitos deletérios do idoso, é importante ressaltar que todo tratamento medicamentosos tem suas indicações e contra-indicações que devem ser criteriosamente estudadas e avaliadas, além da importância em relação ao tempo de uso e a dose do hormônio a ser administrada. Sabemos das indicações e efeitos benéficos em relação à osteoporose, a força muscular e aos demais sintomas da menopausa. Mas, suas contra-indicações também são polêmicas e geram algumas discussões ainda não bem esclarecidas como tromboflebite, acidente vascular cerebral e principalmente o desenvolvimento de câncer de mama.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Metabolismo muscular esquelético e sinalização da insulina**

O tecido muscular é constituído de 75% de água, 20% de proteínas e os restantes 5% compreendidos de sais minerais, glicogênio, glicose, lipídios e de compostos nitrogenados não protéicos, como a creatina, ATP (trifosfato de adenosina) e ADP (difosfato de adenosina). A célula muscular esquelética possui uma membrana celular (sarcolema) que tem como funções manter a integridade do meio intracelular, a permeabilidade seletiva para eletrólitos e substâncias orgânicas, além de contribuir para que o efeito estimulante de um impulso nervoso não se propague de uma fibra muscular às suas vizinhas. O citoplasma (sarcoplasma) preenche todos os espaços intersticiais entre as miofibrilas, e nele encontram-se substâncias dispersas, tais como: mioglobina, grânulos de gordura e de glicogênio, compostos fosforados, íons, enzimas e organelas como retículo sarcoplasmático, mitocôndrias e núcleo. (Aires, 1999).

As fibras musculares podem ser divididas basicamente, quanto às propriedades estruturais e fisiológicas, em fibras do tipo I e II. A fibra muscular tipo I, vermelha, de contração lenta ou oxidativa lenta possui força de contração baixa e é extremamente resistente à fadiga. Estruturalmente possui mais mitocôndrias e mais capilares por fibras e sua principal fonte energética é o sistema aeróbico. A fibra muscular tipo II, branca ou de contração rápida pode ser subdividida em vários grupos, mas especialmente em tipo IIA e IIB (Junqueira e Carneiro, 1999).

A fibra do tipo IIB ou glicolítica rápida possui o tempo de contração mais rápido, a maior força de contração e a menor resistência à fadiga. Seu sistema glicolítico é bem desenvolvido, ao contrário do oxidativo, portanto utiliza basicamente o sistema anaeróbico. A fibra tipo IIA ou oxidativa glicolítica rápida é intermediária entre os tipos I e IIB (Cahill et al., 1997).

A maioria dos músculos humanos é composta por uma mistura de tipos de fibras, músculos tônicos ou posturais, como o sóleo que são geralmente localizados junto ao esqueleto e possui maior proporção de fibras do tipo I. Músculos fásicos ou de contração rápida encontram-se em posição mais superficial e tem maior proporção de fibras tipo II (Garret e Best, 1994).

A homeostasia energética das fibras musculares decorre da constância no suprimento de substratos metabólicos e da integridade das vias metabólicas. O principal substrato utilizado pelas fibras musculares é a glicose, sendo que a sua absorção é de caráter multifatorial, dependendo da insulina, da atividade metabólica tecidual ou ainda da elevação na atividade contrátil das fibras (Anderssen et al., 1993). O suprimento da hexose decorre da translocação de transportadores de glicose tipo GLUT 4 de reservatórios citosólicos para a membrana, favorecendo a elevação das reservas celulares que pode ser direcionado à oxidação, geração de energia ou formação de reservatórios de glicogênio.

Quanto ao transporte de glicose através das membranas das fibras musculares, sabe-se que é um processo mediado por uma família de transportadores de glicose (GLUT) denominados GLUT1, GLUT4 e GLUT5 (Klip e Paquet, 1990). Considerando-se a função dos transportadores, sabe-se que o GLUT 1 é responsável pela captação basal de glicose, o GLUT4, que é o

mais importante, participa efetivamente do controle glicêmico, pois promove a captação de grandes quantidades de glicose, sendo ainda passível de ser translocado de reservatórios vesiculares citosólicos em direção à membrana, e o GLUT5 que é responsável pela captação de frutose. No repouso, a proporção entre o GLUT1 e o GLUT 4 é de 1:1, no entanto, na presença de insulina ou frente à elevação na atividade contrátil, a proporção passa a ser de 1:5, respectivamente (Zierath et al., 1995).

A dinâmica contrátil da musculatura esquelética decorre da atividade de fibras nervosas motoras que ao se interiorizarem no músculo, perdem sua bainha de mielina e ramificam-se (ramos terminais), entrando em contato com a membrana da fibra muscular esquelética através de placas motoras (áreas responsáveis pela transmissão do potencial de ação do nervo para fibra muscular). A quantidade de fibra muscular inervada pelo ramo terminal varia de acordo com o trabalho realizado pelo músculo ou grupamento muscular. Movimentos precisos e delicados necessitam de uma alta densidade de inervação, sendo assim, cada fibra nervosa chega a inervar poucas (3 a 5) fibras musculares. Mas o músculo ou grupo muscular que realiza movimentos sem refinamento motor não necessita de uma alta densidade de inervação, e neste caso uma única fibra nervosa chega a inervar centenas de fibras musculares (Berne e Levy, 2000).

Todo este aparato contrátil, para um perfeito funcionamento, necessita que suas estruturas estejam íntegras. A perda desta integridade por qualquer estímulo que seja, exercício físico de alta intensidade, por exemplo, promove algumas alterações, denominadas lesões musculares, tornando o funcionamento deste aparato deficitário (Hofmann, 1987).



A contração muscular esquelética é desencadeada pelos eventos deflagrados em virtude dos potenciais elétricos gerados na interface da junção neuromuscular, os quais ativam uma série de sistemas transmembrânicos responsáveis tanto pelas variações nas concentrações iônicas citosólicas quanto pela modulação na atividade metabólica. Especificamente no tecido muscular, o padrão metabólico das fibras é determinado de forma multifatorial e influenciado pela sensibilidade à insulina, pela população de receptores, pela atividade de sistemas específicos de captação de glicose ou pela atividade das enzimas-chave do metabolismo de carboidratos (Taylor, 1991).

A homeostasia glicêmica das fibras musculares é mantida à custa da ação da insulina, que exerce efeito direto sobre a célula muscular, facilitando a captação e o metabolismo da glicose, além de regular uma grande cadeia de processos metabólicos celulares. Com relação à sensibilidade tecidual à insulina, sabe-se que o receptor da insulina é sintetizado no retículo endoplasmático na forma de pró-receptor, sendo então transferido para o sistema de Golgi, onde sofre a clivagem proteolítica. As subunidades resultantes, duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , são então submetidas à adição de substâncias como ácidos graxos, glucosamina, fucose e ácido siálico, e assim as subunidades alfa e beta se dimerizam para constituir o receptor maduro que é um heterotetrâmero. As modificações inerentes da fase pós-transdução do receptor, são essenciais para que ocorra sinalização da insulina. A intensidade da ação da insulina pode ser controlada tanto pelo número de receptores na membrana quanto pelo percentual dos mesmos na forma ativa, com atividade tirosina-quinase (Ullrich e Schlessinger, 1990).

No receptor, a região da subunidade  $\beta$  contígua à membrana, no interior da célula, tem a função de regulação. Assim, certos aminoácidos ali localizados controlam o ritmo de internalização endocítica de complexos de receptor-hormônios. Os receptores podem ser degradados ou reciclados para a membrana, segundo as necessidades da célula, sendo seu número na membrana, desta forma, regulado. Em condições normais, a subunidade  $\alpha$  exerce um efeito inibitório sobre a subunidade  $\beta$ , o que reprime a atividade tirosina quinase. A ligação da molécula de insulina com a molécula do receptor promove uma modificação conformacional no receptor, que se inicia na subunidade  $\alpha$  e se propaga à subunidade  $\beta$ , anulando a inibição. A seguir uma molécula de ATP se posiciona na região reguladora do receptor, contígua à membrana e o próximo passo é a autofosforilação, processo característico de toda a família de receptores tirosina-quinase. Embora a correlação entre a estrutura química e função do receptor já tenha sido esclarecida, o elo entre o receptor e sua atividade alvo permanece até então desconhecido (Garcia e Kanaan, 1997).

A musculatura esquelética é quantitativamente o tecido mais importante envolvido na homeostasia glicêmica, visto sua capacidade de captar grandes quantidades de glicose após infusão ou ingestão. As fibras musculares esqueléticas apresentam em condições basais, pequenas concentrações citosólicas de glicose, no entanto, frente à hiperinsulinemia, hiperglicemia ou atividade física, são desencadeados processos facilitadores de uma maior captação da hexose, a qual pode ser prontamente oxidada e liberada na forma de lactato, alanina ou piruvato, ou direcionada para formação de glicogênio (Henriksen et al., 1997).

A estimulação da síntese de glicogênio é uma das maiores respostas fisiológicas moduladas pela insulina, porém, detalhes precisos dos mecanismos pelos quais a insulina atua na síntese de glicogênio nos músculos ainda são desconhecidos. Estudos têm apontado as enzimas glicogênio sintetase kinase-3 (GSK-3) e proteínas-ligantes-fosfatases-1 (PP-1G) como responsáveis pela ativação da enzima glicogênio sintetase (GS) que é a enzima-chave do metabolismo do glicogênio (Srivastava e Pandey, 1998).

## **2.2. Desnervação**

Segundo Henriksen et al. (1997) há um consenso no sentido de que o músculo desnervado difere do músculo normal, visto que a interrupção completa de inervação motora promove a perda imediata da atividade voluntária e reflexa do músculo, seguida de atrofia muscular progressiva durante semanas ou meses seguintes. Alguns estudos demonstraram que concomitante à secção da inervação motora ocorrem expressivas modificações relacionadas ao metabolismo de carboidratos pelas fibras, sendo merecedor de destaque a resistência à insulina, desencadeada pela redução na concentração de fosfatidilinositol-3-kinase (PI3-K) ligada ao receptor da insulina, a redução na população do GLUT4, a redução na concentração citosólica do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do GLUT4, redução na expressão gênica dos transportadores GLUT1 e GLUT4, redução na atividade das enzimas participantes da glicólise, inativação da enzima glicogênio sintetase e redução na habilidade da insulina em ativá-la (Sowell et al., 1991; Elmendorf et al., 1997). Estes eventos associados convergem para a redução na captação e no

metabolismo da glicose predispondo as fibras musculares à atrofia (Coderre et al., 1992; Henriksen et al., 1997).

Diversos estudiosos avaliaram as interações entre a inervação e a homeostasia energética do tecido muscular. Neste aspecto, estudos da integração entre o nervo frênico e o diafragma, *in vivo* e *in vitro*, mostraram que após a secção do nervo, a captação da glicose estimulada pela insulina foi reduzida, comprometendo o metabolismo glicídico deste tecido (Smith e Lawrence, 1984). Os estudos das adaptações metabólicas das fibras musculares na atividade física mostraram a existência de uma população de GLUT4, externalizada dos reservatórios citosólicos para a membrana plasmática, devido à mudança no *status* metabólico da fibra, não dependendo da ação da insulina (Jarvinen et al., 2002), o que levou-se à hipótese do benefício dos tratamentos fisioterapêuticos baseados na cinesiologia, uma vez que influenciam na manutenção da homeostasia energética das fibras.

Para Magnusson et al. (2005) as fibras do músculo desnervado são bioquímica, mecânica, elétrica e morfológicamente diferentes das fibras do músculo normal. Diversos estudos dos efeitos da desnervação sobre a homeostasia energética do músculo sóleo têm demonstrado redução na sensibilidade à insulina, redução na atividade das vias reguladoras do metabolismo de glicose (Lin et al., 2002), redução na captação de glicose, redução na expressão gênica do transportador GLUT4 (Coderre et al., 1992), e redução do metabolismo muscular da glicose, fatores que podem desencadear o processo de hipotrofia (Henriksen et al., 1997; Magnusson et al., 2005). Concomitante à desnervação da musculatura esquelética observa-se redução na ação da insulina, fato altamente expressivo a partir do terceiro dia pós-

desnervação quando se observa redução de 80% nesta sensibilidade (Smith e Lawrence, 1984).

### **2.3. Ciclo estral e Estradiol**

O ciclo estral, em ratas, que pode durar em média de 4 a 5 dias, é constituído de quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (Freeman 1988). A ovulação ocorre durante o estro, quando a fêmea está receptiva ao macho, porém se a fecundação não ocorrer, um corpo lúteo, pequeno e transitório, forma-se durante o metaestro e regride em diestro. O útero, que se apresenta rosado e preenchido por fluidos durante a fase estro, torna-se fino e anêmico na diestro. Durante a fase proestro, novos folículos se formam e o útero novamente aumenta de volume, preparando para uma possível implantação durante o estro seguinte (Hoar e Hickman, 1975).

Alguns estudos demonstraram que as alterações uterinas ocorridas ao longo do ciclo estral devem-se às ações dos esteróides sexuais nestes tecidos. A citologia vaginal também sofre modificações em consequência dos hormônios sexuais, e a identificação dos tipos celulares que constituem o epitélio vaginal, é utilizada para identificação das fases do ciclo reprodutivo (Long e Evans, 1922; Young, Boling e Blandau, 1941; Hoar e Hickman, 1975).

Com relação aos esteróides sexuais, os menores níveis de estradiol são observados durante o estro, ocorrendo um aumento no metaestro para atingir o pico na tarde de proestro (Dupon e Kim, 1973; Butcher e Pope, 1979; Freeman, 1988; Brow e Ferreira, 2005). As variações das concentrações dos hormônios sexuais que ocorrem durante o ciclo estral também influenciam

funções que não estão diretamente relacionadas à reprodução, tais como a secreção de CRH (hormônio liberador de corticotropina), ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) e corticosterona. O aumento dos níveis plasmáticos de estradiol, progesterona e hormônio luteinizante, que ocorre na tarde de proestro, é acompanhado por uma elevação dos níveis de ACTH (Anderson et al., 1997).

Assim, ressalta-se que, em estudos com ratas, é importante o conhecimento e avaliação do ciclo estral devido às flutuações hormonais, além de alterações que podem ocorrer durante alguns tratamentos.

A funcionalidade do estrógeno no músculo esquelético ainda é controversa, e apesar de sua real função ser desconhecida, alguns estudos observaram um importante papel regulador na força muscular, diferenciada durante as fases do ciclo menstrual, destacando uma significativa redução da força muscular durante o período de menopausa (Ciooca e Vargas-Roiga, 1995; Skelton et al., 1999). Há alguns relatos de que não há diferença frente à variação na concentração circulante de estrógeno e alterações da força muscular (Heikkinen et al., 1997) ou ainda que, a molécula pode atuar como antioxidante e estabilizador das membranas das fibras musculares (Tiidus, 1995).

Estudos relacionados à sinalização do estrógeno têm revelado a presença de receptores de membrana ligados a fatores de transcrição, sendo denominados de receptores de estrógeno (ERs), apresentando 3 tipos denominados de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Mangelsdorf et al., 1995).

Existem dois tipos de ERs denominados ER $\alpha$  e ER $\beta$ , ambos com a mesma afinidade ao estrógeno. A exata resposta fisiológica das ações ligadas

a estes receptores ainda não estão definidas, porém, tem sido demonstrado que o sinal é transcrito em uma região de promoção gênica do ácido desoxiribonucléico (DNA) em uma seqüência denominada ERs ou receptores nucleares de estrógeno (Kuiper et al., 1996, 1997). Estudos relacionados à ação fisiológica do receptor tipo ER $\beta$  demonstraram que, este tem ampla expressão no sistema nervoso central, sistema imunológico e outros tecidos como na próstata, no entanto, a potência/atividade deste tipo de receptor está vinculada ao tecido em que se encontra, exercendo ação até mais fraca que o tipo ER $\alpha$  (Cowley et al., 1997; Gustafsson, 2003).

Cabe considerar, que os receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  são expressos na musculatura esquelética humana a nível de RNAm e somente o tipo ER $\beta$  pode ser detectado a nível protéico (Glenmark et al., 2004; Wiik et al., 2005). Estes receptores estão ligados à regulação do metabolismo energético celular, sendo expressos principalmente em tecidos com alta capacidade de metabolizar ácido graxos (Giguere et al., 1988).

Petersson et al. (1997) estudaram a interação/transcrição nos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  e verificaram que, se ambos estiverem presente na mesma célula, o tipo ER $\beta$  exerce ação moduladora e assim, a distribuição do tipo de receptor é que determina o efeito biológico do ligante.

Há mais de 40 anos atrás foi demonstrado pela primeira vez a ligação do 17- $\beta$  estradiol a receptores de membrana no útero, indicando que o efeito biológico é mediado por proteínas receptoras (Jensen e Jacobsen, 1962). Passaram-se 24 anos de estudo até que, em 1982, dois grupos de pesquisa deram início a metodologias de clonagem do receptor estrogênico (Green et al., 1986).

Na década de 90, acreditava-se que havia somente um tipo de receptor de estrógeno (ER) responsável por mediar todos os eventos fisiológicos e farmacológicos de estrógenos naturais, sintéticos ou antiestrógenos. Em 1995, foi detectado e clonado um tipo de ER no ácido desoxirribonucléico clonado (cDNA) da próstata de ratos que foi denominado de ER $\alpha$  e desde então, isoformas desta proteína já foram detectadas em várias espécies e tecidos, reiterando a necessidade de uma reavaliação da sinalização biológica estrogênica (Ogawa et al., 1998).

Os receptores de estrógeno pertencem à família de receptores de transcrição nuclear, que apresentam homologia estrutural composta de estruturas tridimensionais, as quais geram mudanças conformacionais ativadoras de eventos ligados à transcrição, eventos ainda não conhecidos totalmente, que inclui dimerização do receptor, interação com DNA, recrutamento e interação com coativadores, fatores de transcrição e formação de complexos de pré-iniciação. O domínio N-terminal do receptor nuclear apresenta a capacidade de codificar uma função ativadora denominada AF1, onde ocorre a interação protéica através de elementos responsivos aos esteróides (ERE). A comparação do domínio AF1 nos dois tipos de receptores tem revelado que nos receptores ER $\alpha$  a porção é mais ativa no que se refere à estimulação da expressão gênica (Nilsson et al., 2001).

De uma maneira geral, após a chegada do ligante, ocorre à segregação de proteínas denominadas *heat-shock protein* (HPS) que prende o receptor inativo, o qual sofre mudança conformacional ocorrendo dimerização. A dimerização permite acesso ao núcleo e sequencialmente ao domínio AF-2 de coativadores que guiam a seqüência gênica ligada à responsividade



estrogênica. Quanto ao domínio AF-1, acredita-se atuar independente do ligante, processo que ativa a transcriptase do RNA e a mensagem é produzida (Purdie e Beardsworth, 1999).

O estrógeno pode alterar algumas propriedades musculares, uma vez que altera a responsividade a outros hormônios como, por exemplo, o fator similar à insulina (IGF) e ao hormônio do crescimento (GH). É importante salientar, que estes hormônios alteram a homeostasia das fibras musculares, interferindo no tamanho da fibra, na composição da miosina e na síntese protéica (Huss et al., 2004).

O controle diferencial da expressão gênica tem sido o tema central da biologia molecular. Classicamente, tem sido observado que os hormônios lipossolúveis difundem-se através da membrana ligando-se a receptores distribuídos no citoplasma da célula-alvo, sendo deslocados ao núcleo onde compartilham com sítios de domínio existentes no DNA que possuem dois dedos de zinco no sequenciamento gênico (Mangelsdorf et al., 1995).

A sinalização tem início quando o hormônio entra na célula, liga-se ao receptor citoplasmático, dimeriza e se desloca até a porção gênica C-terminal, onde há um sítio de reconhecimento do agente-ligante (AF-1) que é denominado elemento de recepção do esteróide, que se insere no sítio de domínio de ligação do ligante (LBD) e atua como região de reconhecimento do estímulo, assegurando a especificidade e seletividade da resposta fisiológica onde se inicia a ação. Após o acoplamento do ligante nos dedos de zinco do LBD ocorrem mudanças conformacionais, as quais permitem que coativadores protéicos sejam recrutados e o sinal transcrito (Piccone, Brazeau e McCormick, 2005).

## 2.4. Ovariectomia

Poucos estudos têm demonstrado a importância da testosterona circulante no crescimento muscular (Herbst e Bhasin, 2004), porém é pouco avaliado criticamente a importância dos hormônios ovarianos no crescimento muscular (Sitnick et al., 2006). Alguns estudos têm mostrado, que mulheres que estão em menopausa desenvolvem sarcopenia mais cedo do que homens com relação à idade, além de falha na resposta à terapia designada para a indução de crescimento muscular (Sipila et al., 2001; Sorensen et al., 2001). Atualmente, poucos estudos têm conseguido identificar o impacto da cirurgia de ovariectomia na recuperação do músculo esquelético advindo de um período de atrofia muscular (Sitnick et al., 2006).

O declínio nas concentrações estrogênicas plasmáticas durante a menopausa está associado com uma variedade de condições, incluindo ondas de calor, oscilação do humor, perda de massa óssea e muscular. É neste sentido que tem sido prescrito a terapia de reposição hormonal na tentativa de minimizar tais eventos (Green et al., 1986; Johnson et al., 1988; Kuiper e Gustafsson, 1997).

A deficiência dos hormônios ovarianos gera profundos efeitos no metabolismo energético. Em ratas, a ovariectomia está associada com acúmulo de gordura corporal e resistência à insulina, porém, a suplementação com estradiol após a ovariectomia pode prevenir tais alterações (Kumagai, Holmang e Bjorntorp, 1993; Rincon et al., 1996). Assim, esses resultados sugerem que hormônios ovarianos, em particular, o estradiol, regulam o metabolismo de substratos energéticos (Becket, Tchernof e Toth, 2002).

O músculo esquelético tem importância primária na regulação do metabolismo de substratos e na geração de energia. Alterações nos mecanismos enzimáticos de oxidação ou na reserva dos substratos do músculo esquelético podem contribuir para mudanças no metabolismo de gordura e de glicose (Flatt, 1988; Shulman, Bloch e Rothman, 1995; Gayles et al., 1997). A atividade reduzida da  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deidrogenase ( $\beta$ -HADH), enzima que controla a  $\beta$  oxidação de ácidos graxos, está associada ao acúmulo de gordura (Gayles et al., 1997). Além disso, a reduzida atividade da enzima glicogênio sintetase (GS), juntamente com redução na população dos transportadores de glicose e da fosforilação, são de fundamental importância para a resistência insulínica no músculo esquelético (Shulman, Bloch e Rothman, 1995). Relativamente, poucos estudos têm examinado o efeito do estradiol nas vias enzimáticas ligadas a utilização e/ou reservas dos substratos metabolizáveis no músculo esquelético (Ramamani e Aruldas, 1999; Campbell e Febbraio, 2001).

O hormônio estrógeno endógeno na mulher falha no período de menopausa e isso parece estar associado com a perda de massa magra (Poehlman, Toth e Gardner, 1995). A força muscular por unidade de área de secção transversa foi observada ser menor na fase pós-menopausa comparada com a pré-menopausa, e na idade atingida pela mulher na pós-menopausa tem sido aplicada à terapia de reposição hormonal. Em correlação, no estudo de Heikkinen et al. (1997) foi observado que a força dos extensores da coluna foi maior nas mulheres na fase de pós-menopausa que receberam o tratamento com estrógeno do que aquelas que tomaram placebo.

A atrofia do músculo esquelético ocorre devido a inúmeras condições, sendo que a mais importante entre elas é a redução da atividade física (Booth, Chakravarthy e Spangerburg, 2002; Machida e Booth, 2004). Devido à necessidade do músculo esquelético estar íntegro para sucesso na locomoção, respiração, equilíbrio e outras tarefas necessárias para a manutenção e independência funcional, isto é crítico para o entendimento dos mecanismos que são necessários para a recuperação da massa muscular atrofiada. Em animais jovens saudáveis, a massa muscular atrofiada pode ser recuperada através de uma sobrecarga normal regular do músculo após um episódio de suspensão pela cauda ou imobilização. (Booth e Seider, 1979; Booth, Chakravarthy e Spangerburg, 2002; Childs et al., 2003). Isto representa que, um número de mecanismos contribui para este restabelecimento, incluindo ativação de células satélites, aumento da transcrição gênica e da síntese protéica (Booth e Seider, 1979; Chakravarthy, Davis e Booth, 2000; Childs et al., 2003).

Mudanças no controle hormonal da síntese protéica por estrógeno ou testosterona podem também ter um papel na falência da recuperação da massa muscular atrofiada. Ambos hormônios têm influência na massa muscular esquelética e na sua função, e sua deficiência pode potencialmente levar à fraqueza e redução da área da fibra muscular (Dionne, Kinaman e Poehlman, 2000; Roubenoff, 2000; Sorensen et al., 2001; Becket, Tchemorf e Toth, 2002; Herbst e Bhasin, 2004).

A compilação das diferentes propostas encontradas na literatura nos instigou a formular uma hipótese que permitisse adquirir informações adicionais sobre o comportamento químico-metabólico do músculo desnervado. Neste

aspecto muitos estudos mostraram evidências da integração funcional entre a integridade da junção neuromuscular e o perfil metabólico das fibras, porém, há poucas referências quanto à ação do estrógeno no perfil glicogênico de músculos desnervados. Outro aspecto que ressalta é avaliar o comportamento glicogênico da musculatura de ratas ovariectomizadas bem como estudar os eventos decorrentes da reposição estrogênica no equilíbrio energético das fibras e na sensibilidade à insulina.

### 3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do tratamento com 17 $\beta$ -estradiol em músculo esquelético de ratas submetidas à desnervação muscular esquelética e à condição de ovariectomia, obedecendo as seguintes etapas de análise:

- 1) Avaliar as reservas glicogênicas dos músculos de membro posterior de ratas controles, ovariectomizadas e desnervadas tratadas ou não com 17 $\beta$ -estradiol no período de 7 e 15 dias.
- 2) Realizar um estudo de citologia esfoliativa, buscando acompanhar as fases do ciclo estral das ratas controle comparando com as ratas tratadas com 17 $\beta$ -estradiol e/ou ovariectomizadas.
- 3) Verificar se a ovariectomia, a desnervação ou a reposição hormonal podem modificar a ingesta sólida e líquida nas ratas controle e tratadas com estradiol.
- 4) Aplicar o teste de tolerância à insulina (ITT) e o teste de tolerância à glicose (GTT) para avaliar, respectivamente, o índice de decaimento da glicemia e a sensibilidade pancreática nas diferentes condições experimentais.
- 5) Verificar se as situações estudadas modificam o peso corporal e do útero.
- 6) Realizar uma avaliação morfométrica (área da fibra muscular e tecido conjuntivo) do músculo sóleo dos grupos controle, desnervado, ovariectomizado com e sem tratamento com 17 $\beta$ -estradiol por um período de 7 dias.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizadas aproximadamente 78 ratas *Wistar* sexualmente maduras com idade variando de 3 a 4 meses que foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo mantidas em ambiente com temperatura constante de aproximadamente  $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sob protocolo 011/2006 (Anexo 1).

### **4.2 Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em 11 grupos experimentais conforme mostra a tabela 1.

**Tabela 1** - Divisão das ratas em grupos experimentais (n=6).

---

<b>Grupos experimentais</b>
Controle (C)
Controle tratado com estradiol 7 dias (E7)
Controle tratado com estradiol 15 dias (E15)
Ovariectomizado 7 dias (O7)
Ovariectomizado 15 dias (O15)
Ovariectomizado tratado com estradiol 7 dias (OE7)
Ovariectomizado tratado com estradiol 15 dias (OE15)
Desnervado 7 dias (D7)
Desnervado 15 dias (D15)
Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7)
Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15)

---

### 4.3 Procedimentos

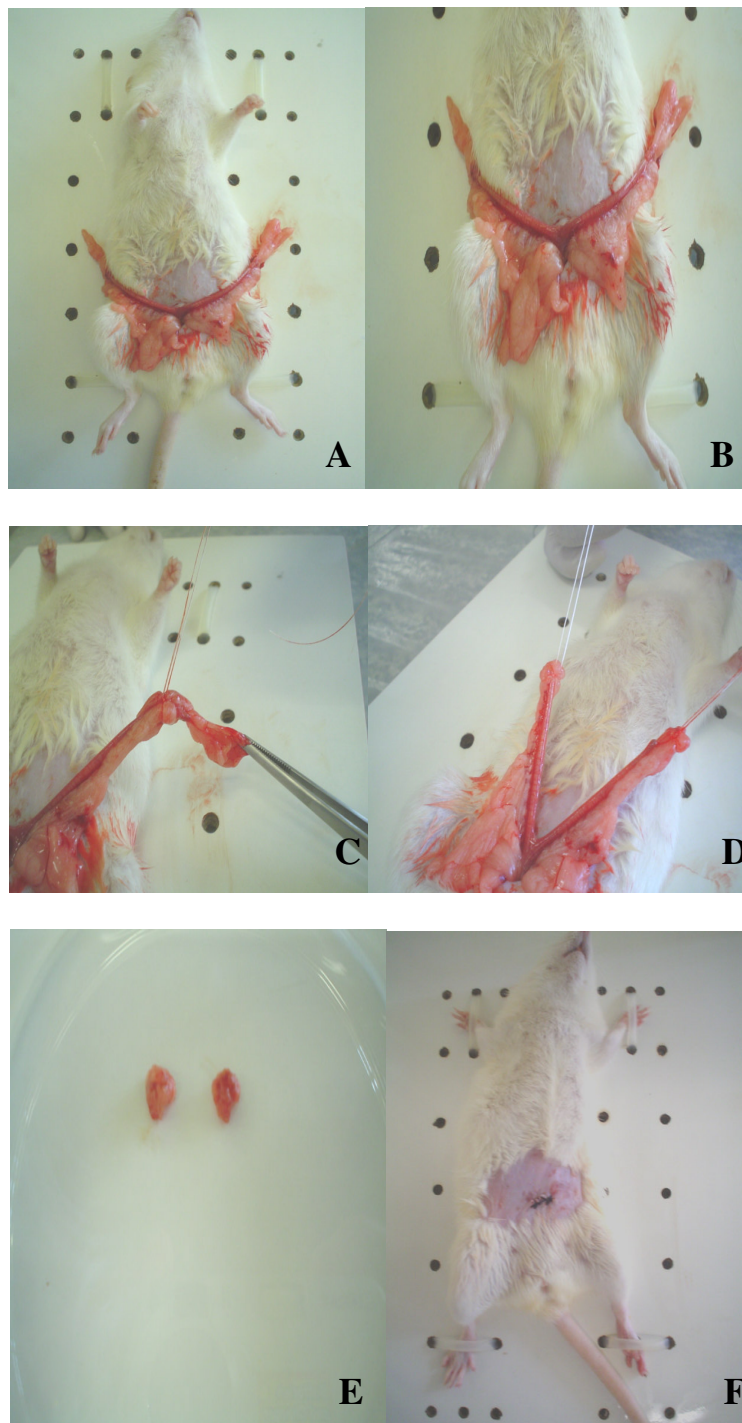
#### 4.3.1 Tratamento com estradiol

Os grupos experimentais tratados com  $17\beta$ -estradiol receberam a medicação na concentração de  $200\mu\text{g}/100\text{g}$  pela via subcutânea (Feng, Li e Wang, 2004), diariamente, no período da manhã e de acordo com o período de cada grupo, sendo de 7 ou de 15 dias.



#### 4.3.2 Ovariectomia

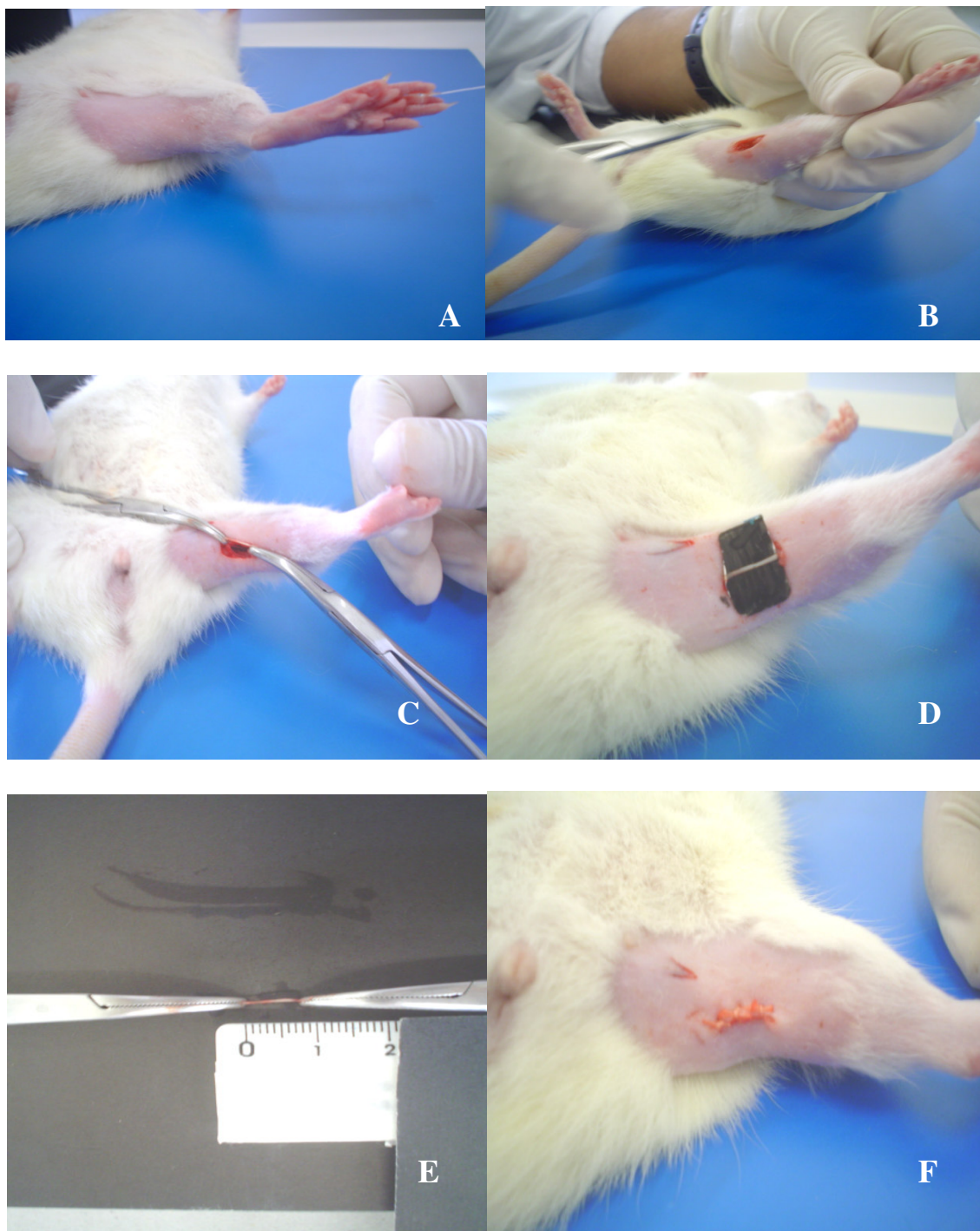
As ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso corporal) e os ovários retirados segundo a metodologia proposta por Robertson et al. (1984) conforme demonstrado na figura 1.



**Figura 1** - Procedimento cirúrgico da ovariectomia. A: rata anestesiada e exposição do útero e ovários; B: posicionamento dos ovários; C: ligadura realizada no ovário; D: útero com os ovários retirados; E: ovários isolados; F: incisão suturada.

### 4.3.3 Desnervação

As ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50mg/Kg peso), sendo a parte posterior da coxa esquerda tricotomizada e uma porção do nervo ciático (1cm) foi seccionado e retirado (Coderre et al., 1992) (Figura 2).



**Figura 2** - Procedimento cirúrgico da deservação. Figura A: exposição do membro posterior tricotomizado; B: incisão para localização da inervação; C: nervo ciático isolado; D: nervo ciático em destaque; E: comprimento do nervo seccionado; F: incisão suturada.

#### **4.4 Amostragem**

Para a amostra sanguínea, após os respectivos períodos de tratamentos as ratas foram decapitadas e o sangue foi coletado, centrifugado 10 minutos a 2500rpm e o plasma separado e encaminhado para análises de glicemia. Para as amostras musculares, após os respectivos períodos de tratamentos as ratas foram sacrificadas pela técnica de deslocamento cervical e os músculos sóleo, gastrocnêmio branco e o gastrocnêmio vermelho foram cuidadosamente isolados, retirados e encaminhados para as avaliações do peso e do conteúdo de glicogênio. Os úteros também foram retirados para a análise de peso.

#### **4.5 Avaliação diária de ingesta (água e ração) e peso corporal**

A pesagem da ração e dos animais foi realizada diariamente com o auxílio de uma balança analítica e a ingesta de água foi analisada por meio de provetas com medidas em mililitros (mL).

#### **4.6 Determinação do glicogênio muscular**

As amostras do músculo foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000rpm durante 15 minutos e o glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a metodologia proposta de Siu, Russeau e Taylor (1970). Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.

#### **4.7 Teste de tolerância à insulina (ITT)**

Para o ITT, ao finalizar os grupos tratados respectivamente por um período de 7 ou 15 dias os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso) e após 40 minutos foram coletadas amostras de sangue pela cauda. Após a primeira coleta (tempo zero) foi injetado insulina regular Biobrás<sup>®</sup> na concentração de 1U/Kg de peso e novas amostras coletadas nos tempos 2,5, 5, 10, 15 e 20 minutos e a glicemia avaliada pelo glicosímetro (ACCU-CHEK<sup>®</sup>). De acordo com o Guidelines of the department comparative medicine at the University of Toronto (Chan 2001).

#### **4.8 Teste de tolerância à glicose (GTT)**

Para o GTT, ao finalizar os grupos tratados respectivamente por um período de 7 ou 15 dias os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso) e após 40 minutos foram coletadas amostras de sangue pela cauda. Após a primeira coleta (tempo zero), foi injetada glicose (1g/Kg de peso) e novas amostras coletadas nos tempos 10,15, 20, 30, 60 e 90 minutos e a glicemia avaliada pelo glicosímetro (ACCU-CHEK<sup>®</sup>). De acordo com o Guidelines of the department comparative medicine at the University of Toronto (Chan 2001).

Obs: Nos testes de sensibilidade acima descritos de ITT e GTT os grupos foram duplicados.

#### **4.9 Determinação das fases do ciclo estral**

A determinação das fases do ciclo estral foi feita diariamente entre 11:00 e 12:00 h, por meio de esfregaço vaginal, durante 15 dias consecutivos. O lavado vaginal foi coletado com uma conta-gotas de vidro preenchida com 1 mL de soro fisiológico (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

Após a coleta, o material foi observado no microscópio óptico, utilizando-se aumento de 10 vezes. A classificação da fase do ciclo estral foi feita pela proporção observada entre o número de células epiteliais nucleadas, células queratinizadas e leucócitos.

A fase de proestro é caracterizada pela presença predominante de células epiteliais nucleadas. O lavado constituído na maior parte por células queratinizadas caracteriza a fase do estro. A fase do diestro é caracterizada por uma proporção maior de leucócitos, enquanto a presença dos três tipos celulares em proporções semelhantes indica a fase do metaestro (Mandl et al., 1951; Hoar e Hickman, 1975).



**Figura 3** - Procedimento de coleta do lavado vaginal utilizado para a determinação do ciclo estral.

## 4.10 Análise morfométrica

### 4.10.1 Processamento das amostras do tecido muscular

O músculo sóleo foi exposto, retirado, pesado e em seguida, o ventre muscular foi colocado em solução tamponada de formol a 10% para fixação.

Após 48 horas de fixação, as peças passaram por desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol, sendo incluídas em paraplast. Com auxílio de um estilete realizamos cortes transversais não seriados de 7 $\mu$ m de



espessura no ventre do músculo sóleo e corados por Hematoxilina-Eosina (H:E).

#### 4.10.2 Análise da área das fibras musculares

Foram selecionados 5 cortes e para cada um deles foram captadas 5 áreas, por meio de um sistema de captação e análise de imagens constituído de um *software* Image Pró-plus 4.0 (Media Cybernects), câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com resolução de 640 por 480 pixels com aumento de 100 vezes (ocular de 10x e objetiva de 10x), sendo que o *software* permitiu visualizar as imagens em uma área da tela de aproximadamente  $190464,12 \mu\text{m}^2$ .

Foram analisadas as áreas de secção transversa de 375 fibras do músculo sóleo por animal, assim determinadas: 15 fibras por área, sendo 5 áreas por corte e 5 cortes por animal. Para a escolha das fibras a serem analisadas, utilizou-se de um retículo com quadrados de  $12100 \mu\text{m}^2$  contendo 20 intersecções de reta, e foram consideradas as fibras que coincidiam com 15 intersecções, de forma aleatória.

#### 4.10.3 Análise do tecido conjuntivo intramuscular

Para essa análise foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos (Mathieu et al., 1981; De Lacerda, 1994), sendo a quantificação realizada por meio de um retículo com quadrados de  $2500 \mu\text{m}^2$  contendo 56

intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal, num total de 1400 pontos por animal.

Desse modo, a área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas intersecções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perímio) pelo número total de pontos.

#### **4.11 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis do peso muscular, peso do útero, glicogênio muscular, glicemia, área sob a curva (GTT), velocidade de decaimento da glicose (ITT), insulinemia, que apresentaram distribuição normal, foi utilizada a ANOVA e teste de Tukey para comparação de mais de 3 grupos e teste t para comparação de 2 grupos.

Já para as variáveis da área das fibras musculares e densidade do tecido conjuntivo, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com objetivo de verificar a diferença entre os grupos. Quando esta diferença era apontada, deu-se continuidade à análise por meio do teste de comparações múltiplas de Tukey HSD.

Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ) e os *softwares* utilizados foram o Origin 6.0<sup>®</sup> e o Prism3<sup>®</sup>.

Os dados estão apresentados com média  $\pm$  epm ou dpm de acordo com a exigência do método experimental.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ciclo estral

A proposta deste trabalho foi acompanhar e avaliar diariamente as fases do ciclo estral das ratas dos grupos controle, ovariectomizado, tratado com estrógeno e ovariectomizado tratado com estrógeno durante os períodos de 7 e 15 dias.

Durante o período de 7 dias, foi observado a periodização do ciclo de ratas controle que se caracterizou pela manutenção em 37,1% na fase proestro, 22,9% no estro, 34,3% na metaestro e 5,7% na diestro. Por outro lado, no grupo tratado com estrógeno durante 7 dias, não houve diferença nas porcentagens referentes aos dias de permanência, conforme mostram as tabelas 2, 3 e 4.

Por sua vez, ao avaliar o grupo ovariectomizado, observou-se que a fase proestro, caracterizada por altas concentrações de estrógeno e progesterona a qual foi mantida em apenas 8,6% do período e a fase diestro, caracterizada por baixa concentração hormonal foi elevada em relação ao grupo controle, representada por 25,7% da semana analisada. Com relação ao grupo ovariectomizado tratado com estrógeno durante 7 dias, essa situação foi revertida, destacando a fase proestro que se manteve em 77,2% do período, conforme pode ser observado nas tabelas 2, 3 e 4.

**Tabela 2** - Porcentagem (%) de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estradiol 7 dias (E7), ovariectomizado 7 dias (O7), e ovariectomizado tratado com estradiol no período de 7 dias (OE7), n=6.

	<b>PROESTRO</b>	<b>ESTRO</b>	<b>METAESTRO</b>	<b>DIESTRO</b>
<b>C</b>	37,1	22,9	34,3	5,7
<b>E7</b>	30,1	34,3	32,8	2,8
<b>O7</b>	8,6	25,7	40	25,7
<b>OE7</b>	77,2	2,8	20	0

**Tabela 3** - Dias de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estradiol 7 dias (E7), ovariectomizado (O7) e ovariectomizado tratado com estradiol (OE7) no período de 7 dias, n=6.

	<b>PROESTRO</b>	<b>ESTRO</b>	<b>METAESTRO</b>	<b>DIESTRO</b>
<b>C</b>	2,5	1,5	2,5	0,5é
<b>E7</b>	2,0	2,5	2,5	0,0
<b>O7</b>	0,5	2,0	2,5	2,0
<b>OE7</b>	5,5	0,0	1,5	0

**Tabela 4** - Caracterização da permanência em cada fase do ciclo estral representada pelo proestro (**P**), metaestro (**M**), diestro (**D**) e estro (**E**) dos grupos controle (C), tratado com estradiol 7 dias (E7), ovariectomizado (O7) e ovariectomizado tratado com estradiol (OE7) no período de 7 dias. n=6, sendo que cada letra representa 0,5 dia.

<b>Dias</b>	<b>1º</b>	<b>2º</b>	<b>3º</b>	<b>4º</b>	<b>5º</b>	<b>6º</b>	<b>7º</b>							
<b>C</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>D</b>
<b>E7</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
<b>O7</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
<b>OE7</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>

Na seqüência, realizou-se a mesma avaliação durante o período de 15 dias, e observou-se que o ciclo do grupo controle caracterizou-se por 30,2% na fase proestro, 13,4% na estro, 43% na metaestro e 13,4 na diestro, sendo que no grupo tratado com estrógeno o período de permanência nas fases não foram diferentes quando comparado ao controle (tabelas 2, 3 e 4).

Com relação ao grupo ovariectomizado no período de 15 dias, observou-se que houve redução da permanência na fase proestro (5,3%) e aumento da fase diestro (45,4%), ressaltando a importância da função endócrina dos ovários. Já no grupo ovariectomizado tratado com estrógeno durante 15 dias, observou-se reversão desse quadro, apresentando 89,4% de permanência na fase proestro e 1% na diestro, conforme mostram as tabelas 2, 3 e 4.

**Tabela 5** - Porcentagem (%) de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estradiol 7 dias (E7), ovariectomizado (O15), tratado com estradiol (E15) e ovariectomizado tratado com estrógeno (OE15) no período de 15 dias, n=6.

	<b>PROESTRO</b>	<b>ESTRO</b>	<b>METAESTRO</b>	<b>DIESTRO</b>
<b>C</b>	30,2	13,4	43	13,4
<b>E15</b>	38	18	34	10
<b>O15</b>	5,3	24	25,3	45,4
<b>OE15</b>	89,4	1,3	9,3	0

**Tabela 6** - Dias de permanência em cada fase do ciclo estral dos grupos controle (C), tratado com estradiol (E15), ovariectomizado (O15) e ovariectomizado tratado com estradiol (OE15), n=6.

	PROESTRO	ESTRO	METAESTRO	DIESTRO
<b>C</b>	4,5	2	6,5	2
<b>E15</b>	5,5	3,0	5,0	1,5
<b>O15</b>	1,0	3,5	3,5	7,0
<b>OE15</b>	13,5	0	1,5	0

**Tabela 7** - Caracterização da permanência em cada fase do ciclo estral representada pelo proestro (**P**), metaestro (**M**), diestro (**D**) e estro (**E**) dos grupos controle (C), tratado com estradiol 15 dias (E15), ovariectomizado 15 dias (O15) e ovariectomizado tratado com estradiol (OE15) no período de 15 dias. n=6, sendo que cada letra representa 0,5 dia.

C	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	D	D	D	D		
E15	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	E	E	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	D	D	D
O15	P	P	E	E	E	E	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	M	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
OE15	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	M	M	M

## 5.2 Ovariectomia e tratamento com estradiol

Após a caracterização do ciclo estral dos grupos, avaliou-se alguns parâmetros que são importantes e indicativos da condição orgânica dos animais, sendo escolhido a análise da glicemia, do peso do útero, peso corporal (média da diferença entre o peso inicial e final) e o volume de ingesta sólida e líquida. Os parâmetros foram acompanhados respeitando os respectivos períodos analisados, destacando que os dois últimos foram acompanhados diariamente.

Com relação ao comportamento do grupo submetido à ovariectomia, a análise realizada nos dois períodos, 7 e 15 dias, mostrou que o procedimento não promoveu alteração na glicemia, um vez que, não diferiram do grupo controle (C:  $95,2 \pm 4,5$ ; O7:  $86,7 \pm 3,1$ ; O15:  $90 \pm 2,6$ ). Na análise realizada após 15 dias, não observou-se diferenças significativas no ganho de peso corporal (g) em relação ao controle, apenas redução de 46,7% no peso do útero se comparado ao controle.

Com relação ao tratamento com estrógeno, a administração desta substância durante 7 ou 15 dias, promoveu alterações significativas na ingesta sólida e líquida, notou-se uma redução de 24,6% na ingesta sólida em gramas (C:  $13,09 \pm 0,3$ ; E7:  $9,87 \pm 0,4$ ) e líquida em mL (C:  $13,09 \pm 0,3$ ; E7:  $17,5 \pm 1,09$ ) em 7 dias de tratamento. Não houve ganho de peso (g) significativo se comparado ao controle (C:  $4,8 \pm 1,7$ ; E7:  $1,8 \pm 2,7$ ), e houve aumento do peso do útero em 230% no período de 7 dias (C:  $587,4 \pm 78,7$ ; E7:  $1938 \pm 724,2$ ), ressaltando que no proestro ocorre pico na concentração plasmática hormonal e o útero aumenta de tamanho e volume, possivelmente devido à retenção hídrica, sendo que a metade dos animais apresentaram aumento do útero e a outra metade estava em ciclo metaestro (conforme visto anteriormente nas fases do ciclo estral, onde a média estava em metaestro nos últimos dias do período), ressaltando que nessa fase ocorre aumento na concentração plasmática de estradiol, mas o útero não aumenta de tamanho, formando um corpo lúteo pequeno e transitório. Assim, o valor de erro padrão da média ( $p < 0,05$ ) sendo grande, pela variabilidade, não houve diferença estatística.

Com relação ao período de 15 dias, observou-se que o peso do útero (g) variou e comparado ao controle, havendo uma diminuição de 67,8%

no grupo ovariectomizado (O15:  $189 \pm 0,03$ ) e um aumento de 464,3% com no grupo ovariectomizado tratado com estrógeno (OE15:  $3.298 \pm 713,4$ )

Com relação à glicemia (mg/dl) não houve diferença significativa pelo tratamento com estrógeno, mantendo-se em normoglicemia (C:  $95,2 \pm 4,5$ ; E7:  $77,4 \pm 2,8$ ; E15:  $73,4 \pm 3,0$ ), mesmo quando administrado na condição de ovariectomia (C:  $95,2 \pm 4,5$ ; OE7:  $77 \pm 1,1$ ; OE15:  $89,5 \pm 4,1$ ).

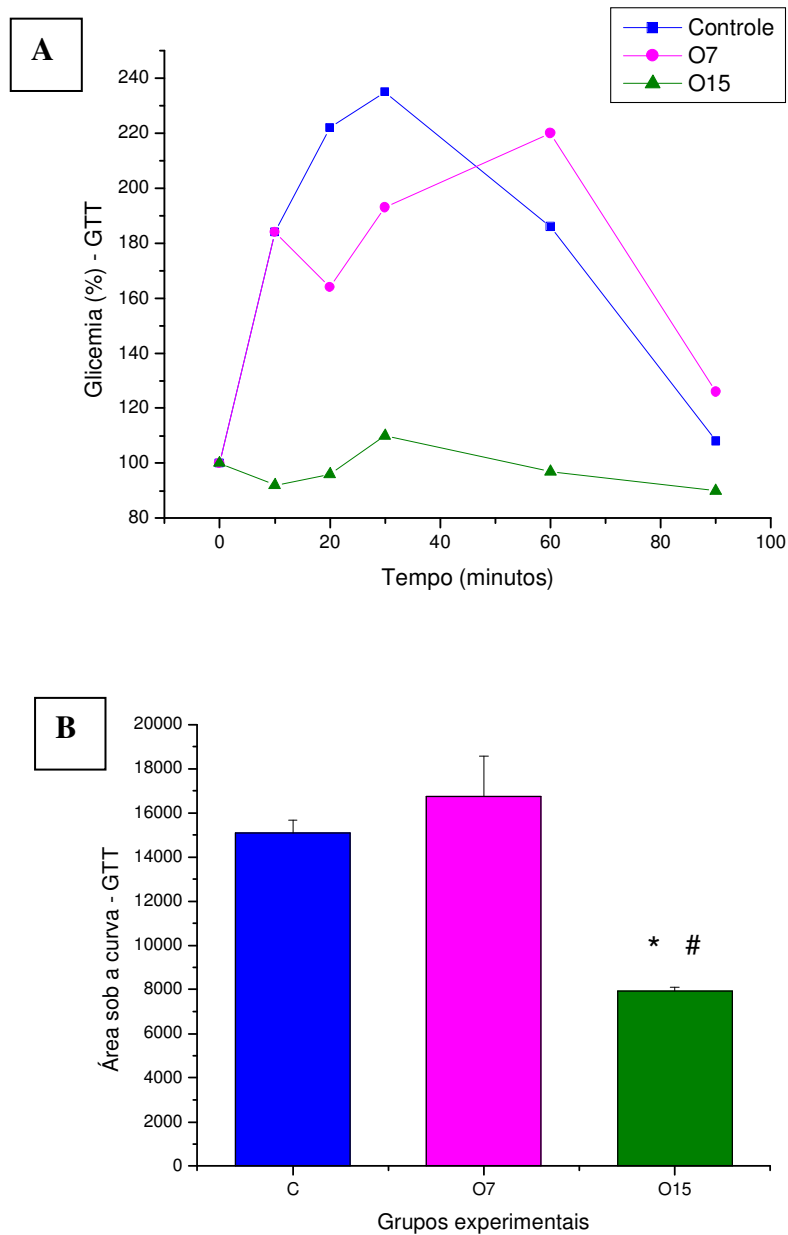
### **5.3. Responsividade do pâncreas e do tecido muscular em animais ovariectomizados e sob tratamento com estradiol**

A responsividade pancreática foi avaliada frente à sobrecarga de glicose, por meio do teste de tolerância à glicose (GTT) quanto a resposta tecidual pelo teste de tolerância à insulina (ITT) no grupo ovariectomizado e tratado com estrógeno durante 7 e 15 dias, uma vez que a ação do estrógeno é importante na regulação metabólica dos tecidos pancreático e muscular.

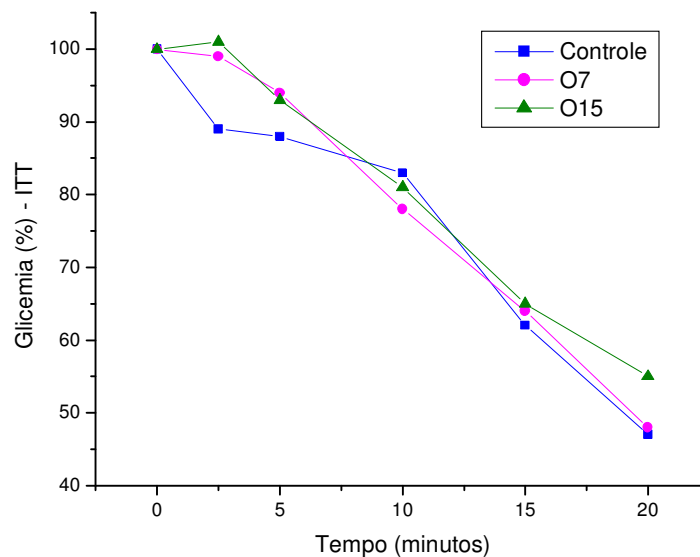
O grupo ovariectomizado durante 7 dias (O7) não apresentou diferença em relação ao grupo controle (C) no GTT e no ITT, representada pela área sob a curva (C:  $15.089 \pm 599,67$  x O7:  $16.752 \pm 1.832,97$ , figura 4) e velocidade de decaimento da glicose (C:  $4,81 \pm 0,54$  x O7:  $3,91 \pm 0,56$ , figura 10), respectivamente. Por outro lado, ao avaliarmos o período de 15 dias, o grupo ovariectomizado (O15) apresentou alteração no GTT representado pela redução de 47,4% na área sob a curva em relação ao grupo controle (C:  $15.089 \pm 599,67$  x O15:  $7.939 \pm 161,43$ ,  $p < 0,05$ , figura 4), indicativo de mudança na resposta pancreática. Com relação ao ITT, a velocidade de decaimento não



apresentou diferença significativa (C:  $4,81 \pm 0,54$  x O15:  $3,92 \pm 0,30$ ,  $p > 0,05$ ,  
Figura 5).



**Figura 4** - Teste de tolerância à glicose (GTT) dos grupos controle (C), Ovariectomizado 7 dias (O7) e Ovariectomizado 15 dias (O15) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B), n=6.  $p < 0,05$ , \* comparado ao controle e # comparado ao Ovariectomizado 7 dias.



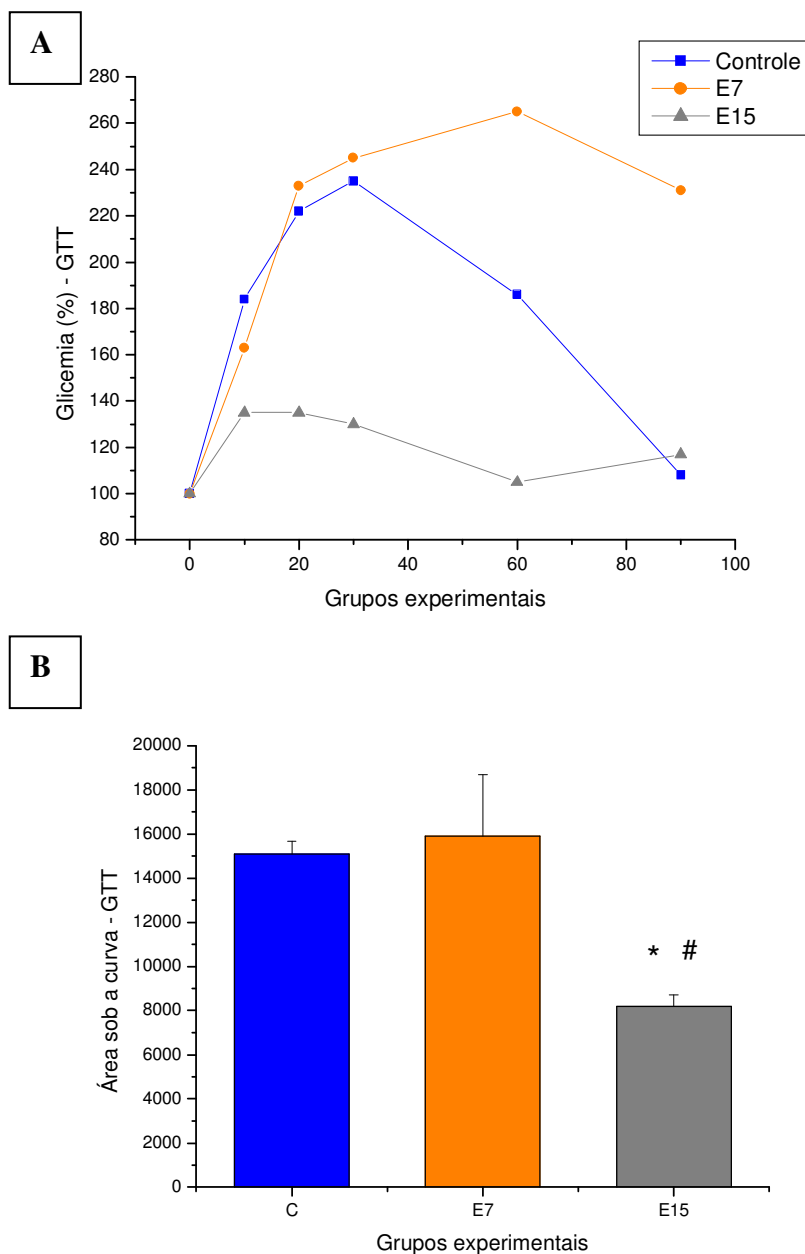
**Figura 5** - % de Decaimento da Glicemia durante o Teste de tolerância à insulina (ITT) dos grupos controle (C), Ovariectomizado 7 dias (O7) e Ovariectomizado 15 dias (O15) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, n=6.

Nos grupos tratados com estrógeno durante os períodos de 7 e 15 dias, o comportamento nos testes aplicados foram similares ao padrão dos grupos ovariectomizados.

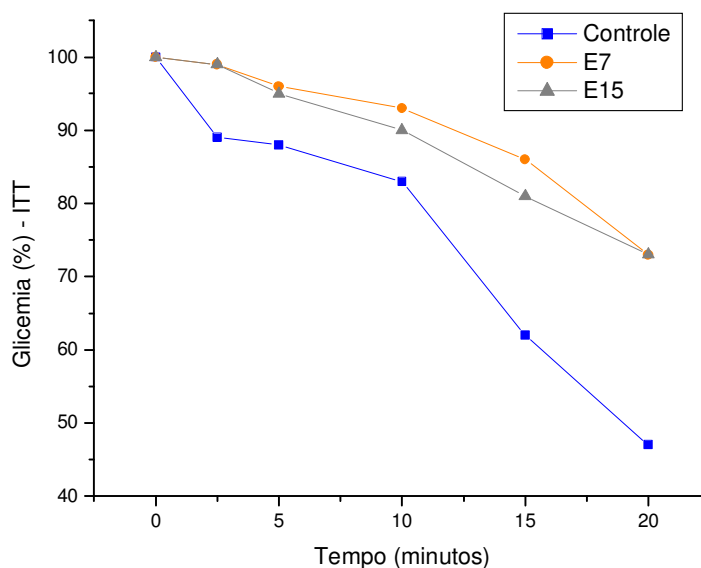
O grupo tratado com estrógeno durante 7 dias (E7) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no GTT (C:  $15.089 \pm 599,67$  x E7:  $15.909 \pm 2.780,23$ , Figura 6) em relação ao grupo controle (C), porém apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) no ITT (C:  $4,81 \pm 0,54$  x E7:  $1,42 \pm 0,14$ , Figura 7).

Com relação ao período de 15 dias, o grupo tratado com estrógeno (E15) apresentou alteração no GTT havendo uma redução de 45,8% na área sob a curva em relação ao grupo controle (C:  $15.089 \pm 599,67$  x E15:  $8.175 \pm 546,60$ ,  $p < 0,05$ , Figura 6), sugerindo a ação hormonal no processo

secretório da insulina. Com relação ao ITT, a velocidade de decaimento apresentou diferença significativa (C:  $4,81 \pm 0,54$  x E15:  $1,56 \pm 0,14$ ,  $p < 0,05$ , Figura 7), mostrando redução 67,6% em relação ao controle, sugerindo a existência de um mecanismo de compensação ativado, possivelmente, no intuito de não gerar hipoglicemia.



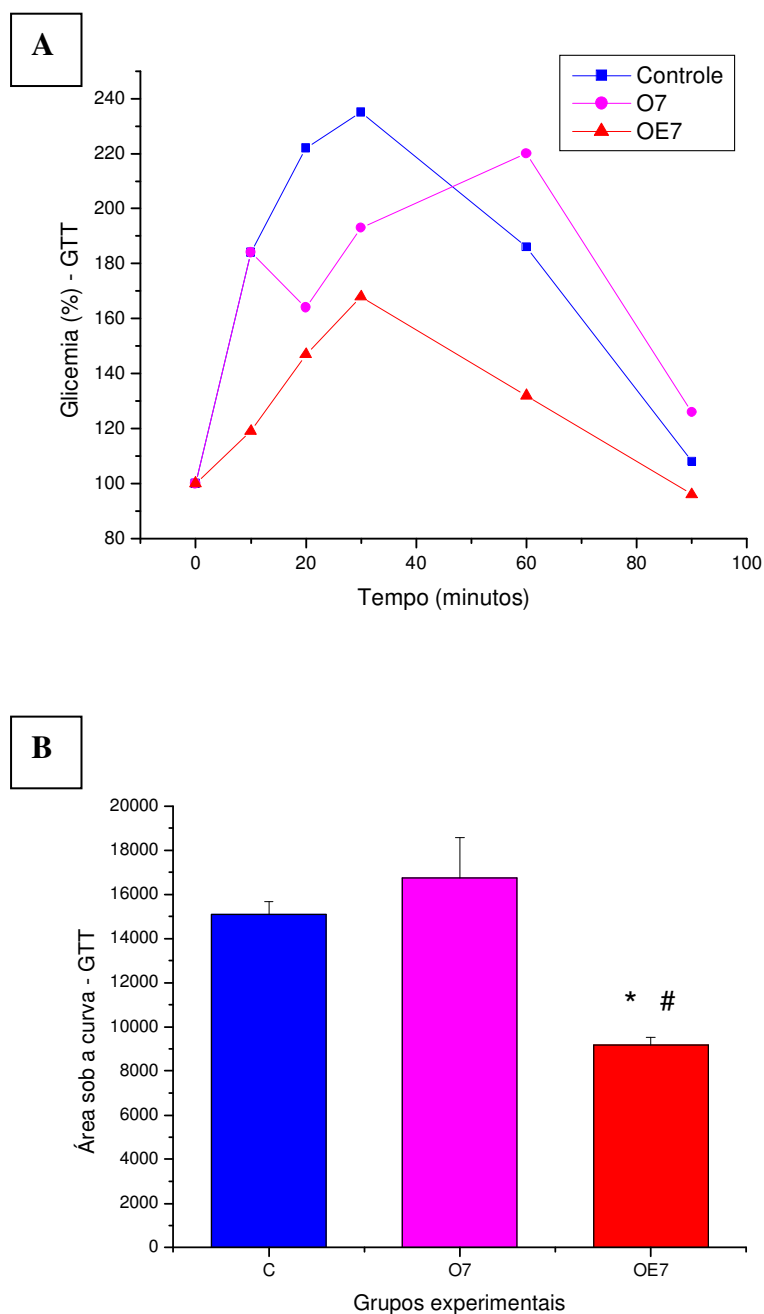
**Figura 6** - Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (C), tratado com estrógeno 7 dias (E7) e tratado com estrógeno 15 dias (E15) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B), n=6.  $p < 0,05$ , \* comparado ao controle e # comparado ao tratado com estrógeno 7 dias.



**Figura 7** - % de Decaimento da Glicemia durante o Teste de tolerância à insulina (ITT) dos grupos controle (C), tratado com estradiol 7 dias (E7) e tratado com estradiol 15 dias (E15) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, n=6.

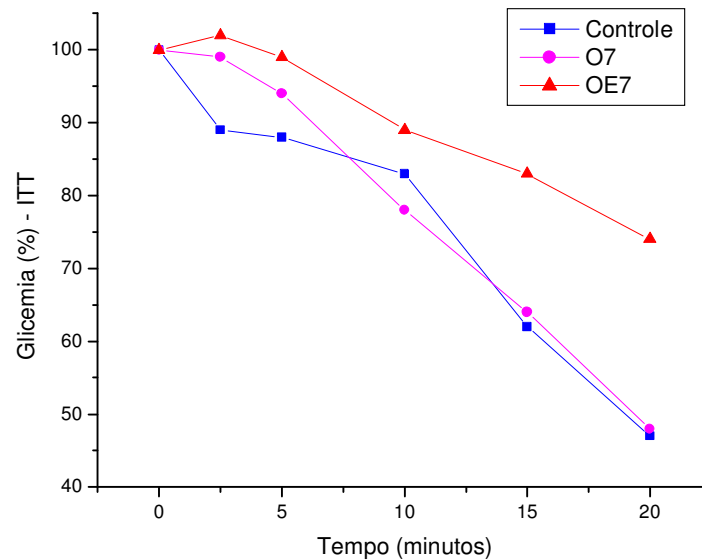
Após a observação individual do efeito da ovariectomia e do tratamento com estrógeno sobre a resposta pancreática (GTT) e tecidual (ITT), a próxima fase do trabalho foi direcionada a avaliar o efeito do tratamento hormonal na condição de ovariectomia, seguindo os dois períodos analisados. No período de 7 dias, o tratamento com estrógeno mostrou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) no GTT avaliado no grupo ovariectomizado (OE7), o que não foi observado no grupo controle tratado, como já demonstrado, sendo que o valor da área sob a curva diminuiu 39,2% em relação ao grupo controle (C:  $15.089 \pm 599$  x OE7:  $9.166 \pm 355$ , Figura 8) e 45,3% em relação ao ovariectomizado (O7:  $16.752 \pm 1.832$ , Figura 8), novamente indicativo de estímulo hormonal na dinâmica secretória de insulina.

Com relação ao ITT, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) de 66,7% no valor da velocidade de decaimento em relação ao controle (C:  $4,81 \pm 0,54$  x OE7:  $1,6 \pm 0,2$ , Figura 9) e de 59,1% em relação ao ovariectomizado (O7:  $3,91 \pm 0,56$ , Figura 9), mostrando um efeito integrador compensatório.



**Figura 8** - Teste de tolerância à glicose (GTT) dos grupos controle (C), ovariectomizado 7 dias (O7) e ovariectomizado tratado com estradiol 7 dias (OE7) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B), n=6.  $p < 0,05$ , \* comparado ao controle e # comparado ao ovariectomizado 7 dias.

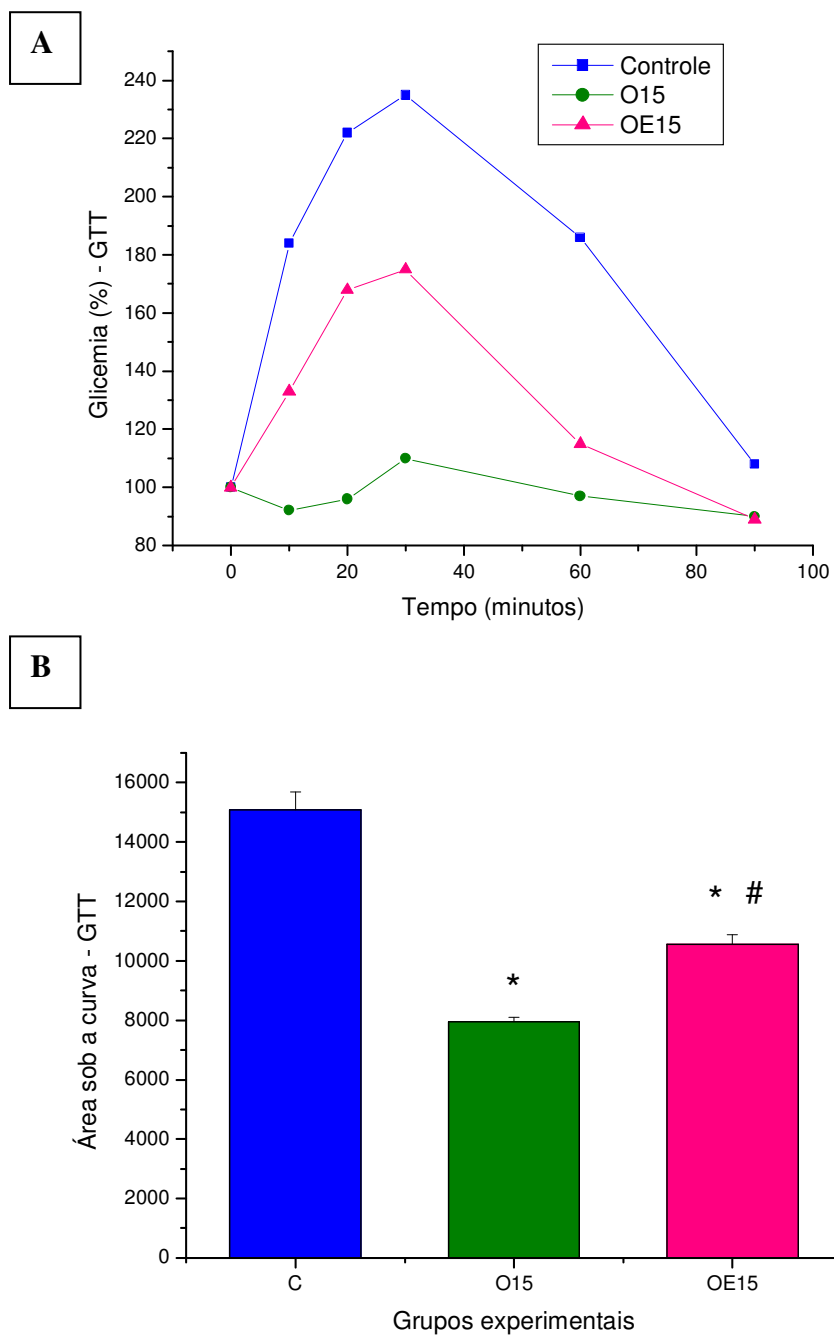




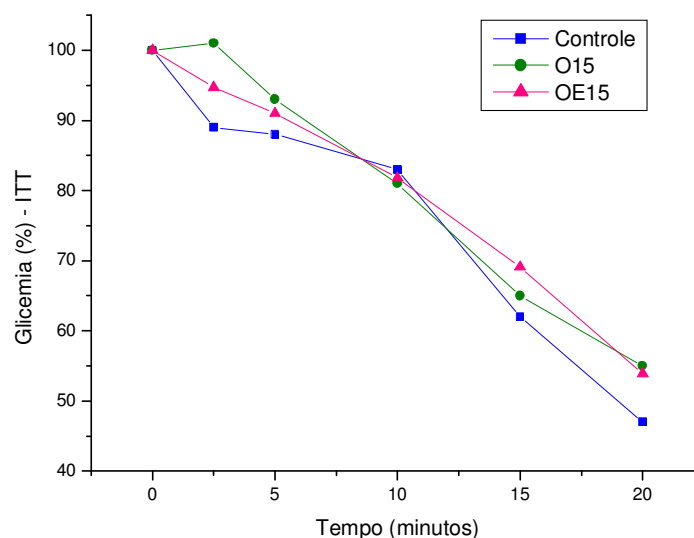
**Figura 9** - % de Decaimento da Glicemia durante o Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 7 dias (O7) e ovariectomizado tratado com estradiol 7 dias (OE7) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, n=6

Com relação ao tratamento com estrógeno no período de 15 dias no grupo ovariectomizado, foi observado um valor da área sob a curva menor (30,10%) com relação ao grupo controle (C:  $15.089 \pm 599,67$  x OE15:  $10.547 \pm 343,11$ ,  $p < 0,05$ ) no teste de tolerância à glicose, apesar do tratamento minimizar a redução quando comparado ao grupo somente ovariectomizado nesse mesmo período, conforme mostra a figura 10, mostrando um aumento de 32,5% (O15:  $7.939 \pm 161,43$  x OE15:  $10.547 \pm 343,11$ ,  $p < 0,05$ ).

Apesar da diferença no teste de tolerância à glicose, a velocidade de decaimento analisada no teste de tolerância à insulina não apresentou diferença significativa no grupo ovariectomizado tratado com estrógeno quando comparado tanto ao controle quanto ao ovariectomizado (C:  $4,42 \pm 0,56$  x OE15:  $3,02 \pm 0,37$  x O15:  $3,92 \pm 0,30$ ,  $p > 0,05$ ), como pode ser observado na figura 11.



**Figura 10** - Teste de tolerância à glicose (GTT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 15 dias (O15) e ovariectomizado tratado com estradiol 15 dias (OE15) representado pela curva glicêmica (%) nos tempos (minutos) 0, 10, 20, 30, 60, 90 (A) e pela área sob a curva (B), n=6.  $p < 0,05$ , \* comparado ao controle e # comparado ao ovariectomizado 15 dias.



**Figura 11** - % de Decaimento da Glicemia durante o Teste de tolerância à insulina (ITT) aplicado nos grupos controle (C), ovariectomizado 15 dias (O15) e ovariectomizado tratado com estradiol 15 dias (OE15) representado pelo decaimento glicêmico (%) nos tempos (minutos) 0, 2.5, 10, 15, 20, n=6.

#### **5.4. Efeito da ovariectomia e do tratamento com estradiol no perfil glicogênico muscular e sobre o peso do músculo sóleo.**

As reservas glicogênicas musculares foram avaliadas, uma vez que este é um parâmetro de fundamental importância na avaliação do estado energético tecidual. Para tanto, nesta fase, o objetivo foi avaliar as reservas de glicogênio dos músculos sóleo, gastrocnêmio porção branca e gastrocnêmio porção vermelha, sob as mesmas condições experimentais já estudadas (Tabela 8).

Os resultados mostram que a ovariectomia não promoveu diferença significativa nas reservas glicogênicas no período de 7 dias, porém após 15 dias, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) de 43,9% no músculo sóleo e de 43,2% no gastrocnêmio porção vermelha, sem diferença no gastrocnêmio porção branca (Tabela 8).

Com relação ao tratamento com estrógeno, observou-se um aumento significativo das reservas glicogênicas nos dois períodos analisados, porém com ação mais expressiva no período de 15 dias. No período de 7 dias, o aumento foi de 41,4% no músculo sóleo, 58,5% no gastrocnêmio porção branca e 40,9% no gastrocnêmio porção vermelha e, no período de 15 dias, o aumento foi de 124,4% no músculo sóleo, 156,1% no gastrocnêmio porção branca e 161,4% no gastrocnêmio porção vermelha.

Quando as condições foram associadas, ou seja, os grupos ovariectomizados foram tratados com estrógeno durante 7 dias, houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) somente no músculo sóleo, representada por aumento de 67,5% no conteúdo de glicogênio, quando comparado ao grupo somente ovariectomizado no respectivo período. Por sua vez, no período de 15 dias, houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas reservas de glicogênio atingindo 169,6% no sóleo, 95,3% no gastrocnêmio porção branca e 140% no gastrocnêmio porção vermelha.

Outro parâmetro avaliado foi o peso do músculo sóleo, não sendo observado alteração significativa quando o grupo ovariectomizado foi comparado ao grupo controle (C:  $109,8 \pm 1,8$ ) em nenhum dos períodos (O7:  $113 \pm 2,0$ ; O15:  $114 \pm 3,8$ ). Com relação ao tratamento com estrógeno, este também não promoveu alteração significativa no peso muscular tanto na

condição controle (E7: 109,1±2,2; E15: 104,2±2,1) quanto na ovariectomia (OE7: 113±6,2; OE15: 109±1,6).

**Tabela 8** - Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) dos grupos controle (C), ovariectomizado 7 dias (O7), ovariectomizado 15 dias (O15), tratado com estradiol 7 dias (E7), tratado com estradiol 15 dias (E15), ovariectomizado tratado com estradiol 7 dias (OE7) e ovariectomizado tratado com estradiol 15 dias (OE15).

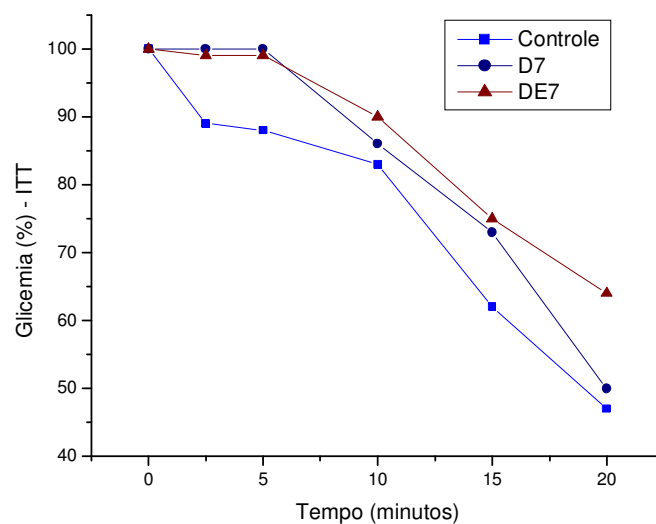
Grupos	S	GB	GV
C	0,41±0,02	0,41±0,02	0,44±0,02
O7	0,40±0,04	0,43±0,03	0,42±0,01
O15	0,23±0,02*	0,43±0,05	0,25±0,02*
E7	0,59±0,03*	0,65±0,03*	0,62±0,05*
E15	0,92±0,06*	1,05±0,11*	1,15±0,09*
OE7	0,67±0,11*	0,45±0,04	0,53±0,10
OE15	0,62±0,04#	0,84±0,05#	0,60±0,03#

Os valores representam à média ± epm, n=6. p<0,05, \* comparado ao controle, # comparado ao respectivo ovariectomizado.

## 5.5 Desnervação

A condição de desnervação neuromuscular representa o mais expressivo comprometimento anátomo-histo-fisiológico muscular. Desta forma, buscou-se com este estudo uma correlação entre o tratamento com estrógeno e sua ação na musculatura esquelética.

Nesse íterim, primeiramente foi realizado o teste de tolerância à insulina nos grupos controle, desnervado 7 dias e desnervado tratado com estrógeno 7 dias para observar a resposta tecidual periférica e a ação estrogênica nessa condição de desuso. Assim, foi observado que houve uma redução significativa de 32,4% na velocidade de decaimento da glicose no grupo desnervado (D7:  $3,25 \pm 0,27$ ) e de 52,8% no grupo desnervado tratado com estrógeno (DE7:  $2,27 \pm 0,25$ ) em relação ao controle (C:  $4,81 \pm 0,54$ ), ressaltando que houve diferença significativa entre os dois grupos desnervados, conforme mostra a figura 12.



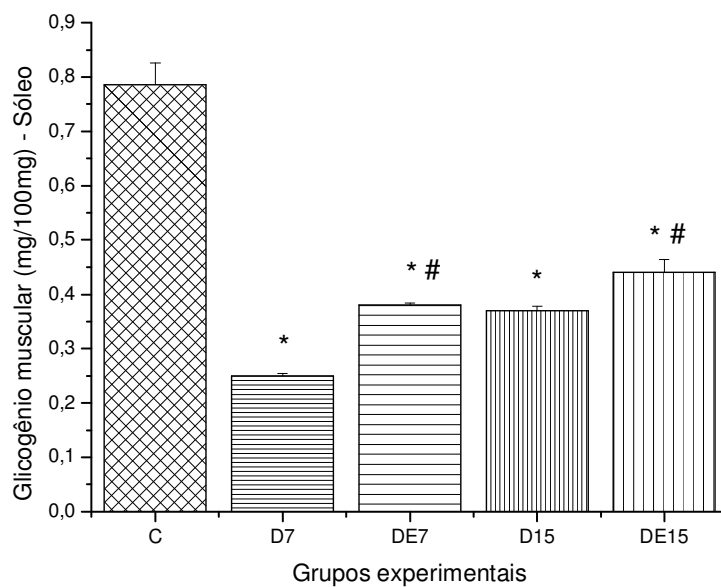
**Figura 12** - % de Decaimento da glicemia durante o Teste de tolerância à insulina (1U/kg) dos grupos controle, desnervado 7 dias (D7) e desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7). Os valores correspondem à média  $\pm$ epm, n=6.

Após a observação da resposta tecidual periférica à sobrecarga de insulina, o objetivo subsequente foi avaliar as reservas de glicogênio dos

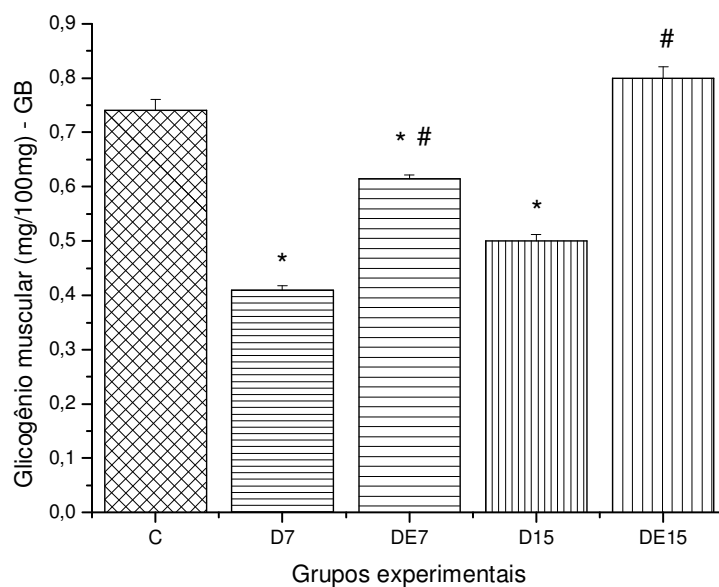
músculos sóleo, gastrocnêmio porção branca e gastrocnêmio porção vermelha, além do peso do sóleo, dos grupos: controle, desnervado 7 dias e desnervado tratado com estradiol 7 dias. Também foram avaliados os grupos desnervado e desnervado tratado com estrógeno durante o período de 15 dias.

Em decorrência da desnervação houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no conteúdo muscular de glicogênio, atingindo no músculo sóleo 44% nos primeiros 7 dias e 62% após 15 dias ( $p < 0,05$ ). No músculo gastrocnêmio porção branca, a redução atingiu 32% nos primeiros 7 dias e 44% após 15 dias e no músculo gastrocnêmio porção vermelha, a redução atingiu 32% nos primeiros 7 dias e 53% após 15 dias de tempo. Ao avaliarmos o conteúdo glicogênico do músculo desnervado observamos que, após 7 dias de tratamento diário com estradiol, o músculo sóleo apresentou elevação de 19% enquanto o gastrocnêmio porção branca apresentou elevação de 60% e o gastrocnêmio porção vermelha apresentou elevação de 18% ( $p < 0,05$ ). Após o tratamento com estrógeno durante 15 dias, as reservas também foram elevadas, atingindo 52% no sóleo, 51% no gastrocnêmio porção branca e 11% no gastrocnêmio porção vermelha ( $p < 0,05$ ), conforme mostra figura 13, 14 e 15.

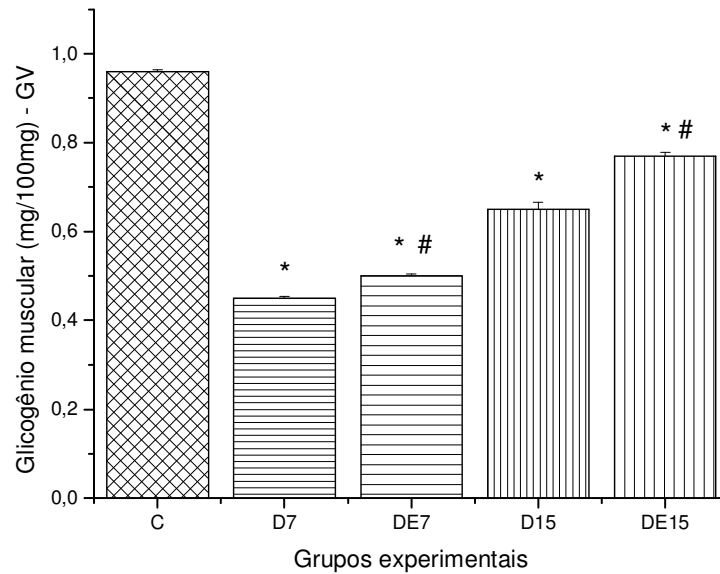




**Figura 13** - Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média $\pm$ epm, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.



**Figura 14** - Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção branca (GB) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estrógeno 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estrógeno 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.



**Figura 15** - Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção 1vermelha (GV) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.

Com relação ao peso muscular do sóleo, a desnervação após 7 dias promoveu uma redução significativa ( $p<0,05$ ) de 29,7% em relação ao controle e após 15 dias essa redução foi maior, representada por 36,6% (tabela 9).

**Tabela 9** - Peso muscular (mg) do sóleo dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estradiol 15 dias (DE15).

<b>Grupos</b>	<b>Peso muscular (mg)</b>
<b>C</b>	101±1,7
<b>D7</b>	71±2,9*
<b>DE7</b>	84±8,9*
<b>D15</b>	64±1,4*
<b>DE15</b>	63±2,4*

Os valores correspondem à média±epm, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.

O tratamento com estrógeno não foi suficiente em minimizar a redução do peso muscular em nenhum dos períodos analisados, mostrando aumento não significativo ( $p>0,05$ ) em 7 dias, representado por 18,3%, sem alteração durante 15 dias em relação ao respectivo grupo desnervado.

## 5.6 Análise morfométrica do músculo sóleo

Com relação à análise morfométrica do músculo sóleo, nesse estudo, os parâmetros analisados foram a área da fibra muscular e a densidade do tecido conjuntivo. Com relação ao período escolhido foi o de 7 dias e os grupos experimentais foram: controle, tratado com estradiol, ovariectomizado, ovariectomizado tratado com estradiol, desnervado e desnervado tratado com estradiol, conforme mostra a tabela 10.

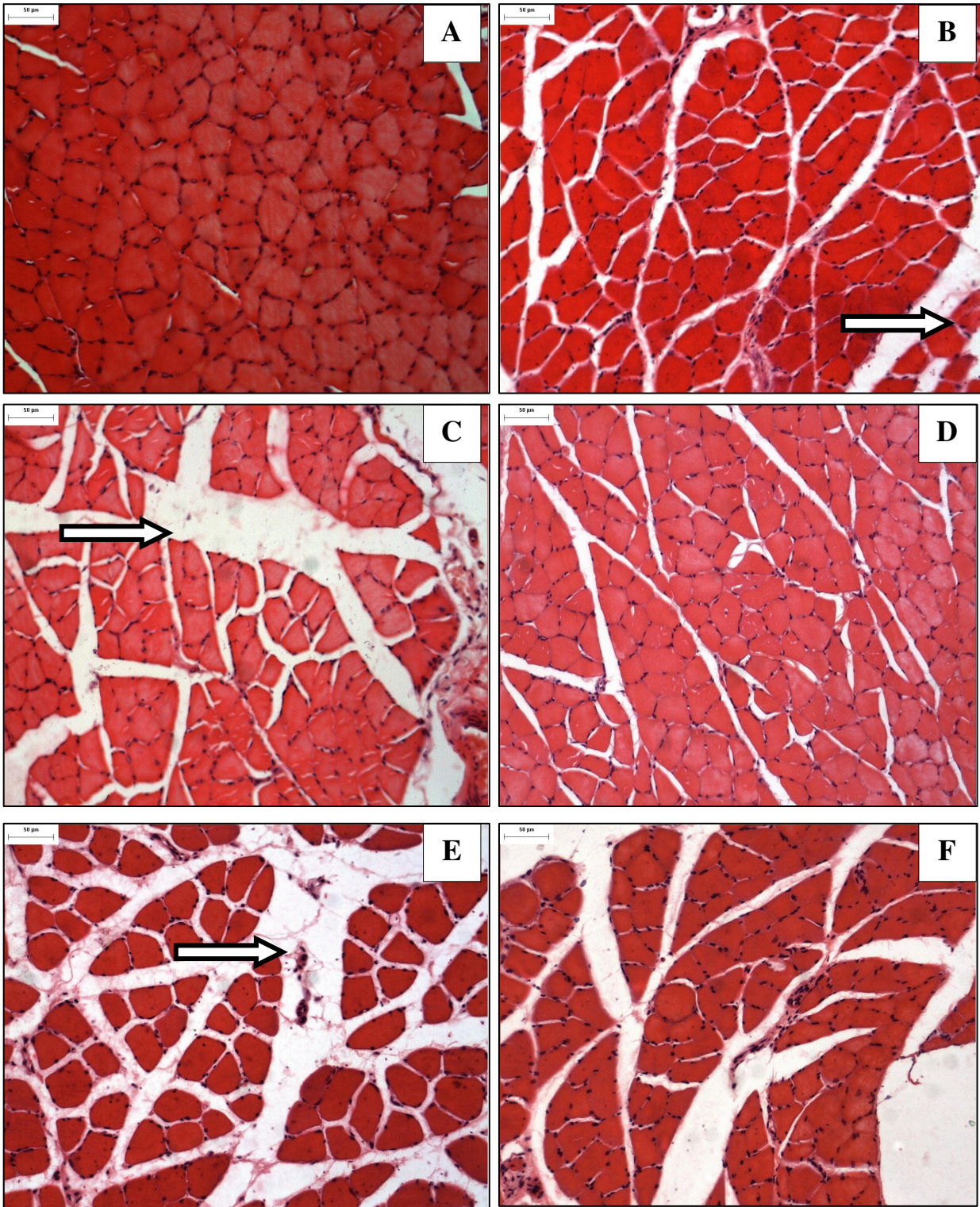
O tratamento com estrógeno durante 7 dias não promoveu alteração na área da fibra, porém houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 80,4% na densidade da área do tecido conjuntivo.

Com relação ao grupo ovariectomizado, também não ocorreu alteração na área, no entanto, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) de 259,4% no tecido conjuntivo em relação ao grupo controle. Porém, quando o grupo ovariectomizado foi tratado com estrógeno, o aumento do tecido conjuntivo foi menor (152,4%,  $p < 0,05$ ), representado por uma redução de 29,8% ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo ovariectomizado.

Na condição de desnervação, houve redução de 27,2% ( $p < 0,05$ ) na área da fibra bem como aumento de 238,4% ( $p < 0,05$ ) na densidade de área do tecido conjuntivo. No entanto, quando o grupo desnervado foi tratado com estrógeno, o aumento na proliferação do tecido conjuntivo foi menor (133,4%,  $p < 0,05$ ), sendo que quando comparado ao grupo desnervado, houve redução de 31% ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10** - Valor da média $\pm$ dpm da área da fibra ( $\mu^2$ ) e da densidade de área do tecido conjuntivo (%) dos grupos controle (C), tratado com estradiol 7 dias (E7), ovariectomizado 7 dias (O7), ovariectomizado tratado com estradiol 7 dias (OE7), desnervado 7 dias (D7) e desnervado tratado com estradiol 7 dias (DE7). n=6,  $p < 0,05$ , \* comparado ao controle, # comparado ao respectivo grupo tratado.

	<b>C</b>	<b>E7</b>	<b>O7</b>	<b>OE7</b>	<b>D7</b>	<b>DE7</b>
<b>Área</b>	2234 $\pm$ 349	2198 $\pm$ 302	2306 $\pm$ 371	2271 $\pm$ 229	1626 $\pm$ 352*	1712 $\pm$ 319*
<b>Conjuntivo</b>	10,48 $\pm$ 5,43	18,91 $\pm$ 6,05*	37,67 $\pm$ 5,69*	26,45 $\pm$ 6,43*#	35,47 $\pm$ 7,17*	24,46 $\pm$ 4,31*#



**Figura 13** - Corte histológico do músculo sóleo dos grupos controle (A), tratado com estradiol (B), ovariectomizado (C), ovariectomizado com estradiol (D) desnervado (E), desnervado com estradiol (F). Observe aumento de tecido conjuntivo em B, C e E (seta) quando comparado ao A e redução em D e F quando comparado à respectiva condição (C e E, respectivamente). Coloração Hematoxilina-Eosina, 100x.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Ciclo Estral

Nossa proposta experimental se fundamenta em avaliar o efeito do tratamento com cipionato de estradiol no músculo esquelético de ratas submetidas a diferentes condições experimentais que comprometem a homeostasia metabólica, no intuito de conhecer se a terapia hormonal pode ser coadjuvante de outras terapias fisioterapêuticas. Assim, não é nossa intenção, com este procedimento mimetizar as variações cíclicas estrogênicas que são seqüencialmente deflagradas durante o ciclo estral, mas sim, avaliar o comportamento das reservas energéticas em ambiente hipo ou hiperestrogênico.

O ciclo estral é caracterizado por variações nas concentrações plasmáticas de diferentes hormônios, especialmente dos esteróides sexuais. Conhecidamente, o ciclo estral da rata tem a duração de quatro a cinco dias e apresenta 4 fases denominadas de proestro, estro, metaestro e diestro, as quais ocorrem seqüencialmente, sendo caracterizadas por concentrações variáveis dos hormônios progesterona e estrógeno, os quais determinam um perfil citológico vaginal que pode ser observado/analísado por meio do esfregaço (Marcondes et al., 2001). Neste sentido, a avaliação realizada no grupo controle no período de 7 ou 15 dias, mostrou que as variações do ciclo estavam dentro do padrão descrito na literatura, sugerindo que em condições normais de bioterismo, ou seja, sem intercorrências, não houve nenhum fator que interferiu direta ou indiretamente nas respostas que conhecidamente

alteram as funções dos núcleos hipotalâmicos e, conseqüentemente, refletem em mudanças na secreção endócrina como no caso de estresse (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

Quando se estuda suplementação hormonal tem-se que considerar sua influência no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, uma vez que, os núcleos hipotalâmicos atuam de acordo com a ritmicidade gerada em micropulsos e em consonância com o controle feed-back gerado pela secreção hormonal do órgão-alvo (Mandoki et al., 2004). Ao avaliar o efeito da suplementação com 17 $\beta$ -estradiol em ratas controle, observou-se que não houve modificação expressiva na periodicidade dos ciclos. Neste contexto, acredita-se que ao administramos o hormônio, obedecendo com fidedignidade a dose administrada e o horário da aplicação, induziu-se elevação na concentração plasmática até doses supra-fisiológicas, criando um meio hiperestrogênico e por se tratar de ratas normais, possivelmente seja estimulada a aquisição de uma ritmicidade cronobiológica, reorganizando as funções das áreas secretoras e concomitante modulação na população e sensibilidade dos receptores presentes nos tecidos-alvo, buscando restabelecer o equilíbrio (*steady state*). Associado a isto, sabe-se que a elevação na concentração plasmática hormonal induz adaptações nas funções hepáticas, alterando o tempo de permanência do hormônio no plasma, elevando o metabolismo hepático e regulando com isto a biodisponibilidade e o tempo de ação do hormônio.

A ovariectomia é um processo cirúrgico que promove a redução de 75% na concentração plasmática de estrógeno, sendo considerado um efetivo método hipoestrogênico, que não deve ser interpretado como insucesso da



cirurgia, uma vez que as glândulas supra-renais e o tecido adiposo, também produzem estes hormônios. Cabe salientar que, apesar de não se acompanhar diariamente a concentração plasmática de  $\beta$ -estradiol, a eficácia do método pode ser comprovada por alterações na citologia esfoliativa e/ou redução da massa uterina (Latour, Shinoda e Lavoine, 2001).

Tendo em vista que, os ovários são os órgãos responsáveis pela síntese/secreção dos hormônios estrógeno e progesterona, acompanhou-se o ciclo estral em um grupo de ratas ovariectomizadas por 7 ou 15 dias, ou seja, submetidas a um meio hipostrogênico, e constatou-se que a fase proestro, caracterizada por elevadas concentrações de estrógeno e progesterona, foi mantida em menores períodos, atingindo apenas 8,6% enquanto a fase diestro, caracterizada por baixa concentração hormonal, foi a mais expressiva se comparado ao grupo controle, reiterando a efetividade da função endócrina dos ovários enquanto principal fonte de produção e secreção de estrógenos e progestagenos (Freeman, 1988).

No intuito de avaliar a influência do  $17\beta$ -estradiol na ausência da atividade secretória ovárica, submeteu-se um grupo de ratas ovariectomizadas durante 7 e 15 dias ao tratamento com o estrógeno. Nestes grupos, observou-se o predomínio da fase proestro, indicativo da presença/ação de efetivas concentrações hormonais circulantes, uma vez que, expressou ação sobre tecidos-alvos, representados por modificações na citologia esfoliativa, corroborando com estudos realizados por Marcondes (1998).

Para ampliar o entendimento sobre os eventos desencadeados em decorrência da ovariectomia, optou-se por avaliar alguns parâmetros

importantes e indicativos das condições orgânicas dos animais, iniciando pela avaliação do peso uterino e verificou-se que ratas ovariectomizadas não apresentam alterações precoces na homeostasia da musculatura uterina, tendo em vista que, nos primeiros 7 dias não houve mudança no peso do útero, havendo redução expressiva somente após 15 dias da cirurgia, quando a atrofia torna-se evidente. Estes resultados mostram a interdependência entre o equilíbrio homeostático da musculatura uterina e a presença dos hormônios estrogênicos, indicando que na falta deste hormônio, processos indutores de atrofia são desencadeados (Sasa et al., 2001).

As avaliações realizadas nos grupos ovariectomizados demonstraram redução expressiva no peso uterino após 15 dias da cirurgia, indicativo de atrofia, assim, direcionou-se o estudo para a avaliação da suplementação com  $17\beta$ -estradiol sobre esta musculatura uterina de ratas normais e ovariectomizadas. Inicialmente, não observou-se alterações em ratas normais tratadas, por outro lado, observou-se que o  $17\beta$ -estradiol impediu a perda de peso do útero ovariectomizado, uma vez que, o peso do útero tratado foi expressivamente maior do que aquele que o ovário foi retirado, sugerindo um efeito anti-catabólico que reflete a duplicidade de ação do estrógeno, atuando na via genômica e não-genômica no controle da homeostasia da musculatura uterina (Latour, Shinoda e Lavoine, 2001).

Cabe ressaltar, que o estrógeno modula as funções de diversos tecidos-alvo, além daqueles classicamente descritos na literatura como o útero e a glândula mamária, uma vez que, após 15 dias de ovariectomia os animais apresentaram um ganho de peso acima dos índices de normalidade, sugerindo que, possivelmente, os núcleos hipotalâmicos responsáveis pelo controle da

fome sejam modulados e influenciados pelas variações nas concentrações plasmáticas de estrógeno (Kow e Pfaff, 1985; Kow et al., 2004).

Ao avaliarmos os resultados, até aqui demonstrados, passou-se a fazer algumas considerações de fundo neurofisiológico, no intuito de buscar uma explicação para esclarecer ações, ajustes e a integração funcional. Inicialmente, destacou-se que o hipotálamo é uma região encefálica com atividade multifuncional, recebendo e transmitindo informações que controlam ações e comportamentos (Cushing e Wynne-Edwards, 2006). Esta região é constituída de núcleos com atividade integrada, destacando-se entre eles, o núcleo ventromedial (VMN), o qual quando estimulado, promove elevação na secreção de glucagon e conseqüentemente na glicemia, por outro lado, quando o estímulo cessa, a secreção de insulina é deflagrada (Shimazu e Ishikawa, 1981). Considerações histofisiológicas do núcleo ventromedial hipotalâmico demonstraram que há uma intensa comunicação via interneurônios com o núcleo motor dorsal do vago, neurônios pré-ganglionares da medula e neurônios do córtex pré-frontal, regiões que apresentam uma alta população de receptores de estrógeno, demonstrando que há uma ação moduladora por parte do estrógeno nas funções hipotalâmicas (McClellan et al., 1984).

Um estudo avaliou a lesão da trajetória dos quadrantes lateral e caudal do núcleo ventromedial hipotalâmico desligando a comunicação entre as áreas e verificou que houveram mudanças biofísicas na atividade neuronal ligadas à polaridade, amplitude e duração dos potenciais de ação, com variações de amplitude mais significativas nas ratas, cujo corte atingiu mais o quadrante posterior do que o lateral. É interessante considerar que, nesta área, o estrógeno reduz a geração de potenciais antidrômicos, reduzindo o limiar e

encurtando o período refratário absoluto. Um segundo ponto merecedor de destaque, é que a análise histológica revelou a intensa interação celular na extremidade rostral do núcleo ventromedial hipotalâmico e áreas adjacentes retroquiasmática, região onde estrógeno regula a neurotransmissão e coordena o comportamento alimentar. Desta forma, variações cíclicas na concentração plasmática de estrógeno induzidas pela ovariectomia ou pela elevação na concentração plasmática gerado pela administração do hormônio, induzem ajustes seqüenciais na busca do equilíbrio homeostático na atividade dos núcleos hipotalâmicos (McClellan et al., 1984; Sakuma e Akaishi, 1997). Esse fato se relaciona aos resultados do presente estudo, pois, quando foi realizado o teste de tolerância à glicose foi demonstrado um comportamento diferenciado, considerando-se que no 7º dia não houve mudança significativa, enquanto no 15º dia houve hipersensibilidade das células  $\beta$  pancreáticas frente à sobrecarga de glicose, representada pela menor área sobre a curva. Variações nas respostas desencadeadas pelo teste de tolerância à insulina foram observadas no grupo tratado com o  $17\beta$ -estradiol, demonstrando que, além da capacidade de influenciar na atividade dos núcleos hipotalâmicos, também atua na modulação do processo secretório da insulina (Schwartz et al., 2000).

Ao avaliar o índice de ingesta em ratas tratadas com estrógeno, observou-se que houve redução na ingesta, demonstrando a ação moduladora do estrógeno nos núcleos hipotalâmicos, que comandam a interface fome/saciedade, uma vez que, tem sido relatado que baixas concentrações plasmáticas de estrógeno promovem aumento no peso indicando um possível envolvimento com a expressão do gene ob (Yoneda et al., 1998). Na condição

hipoestrogênica, a ativação da área da fome é revertida quando se suplementa com 17 $\beta$ -estradiol (Latour, Shinoda e Lavoine, 2001).

## **6.2 Modulação da sensibilidade à insulina pelo estradiol**

Esta fase experimental foi direcionada à avaliação das relações adaptativas entre a atividade das células  $\beta$  frente à sobrecarga com glicose e a sensibilidade do tecido-alvo à insulina.

Desde a década de 90, tem sido sugerido que o estrógeno exerce ação no processo secretório da insulina, promovendo atividade elétrica na forma de *burst* nas células  $\beta$  pancreáticas, induzindo com isto a secreção de insulina (Nadal et al., 1998).

Para avaliar esta ação insulínica, inicialmente realizamos o teste de tolerância à glicose (GTT) e o teste de tolerância à insulina (ITT) em ratas ovariectomizadas tratadas ou não com 17 $\beta$ -estradiol. Neste estudo, não observamos alterações na resposta pancreática à sobrecarga de glicose bem como na sensibilidade tecidual à insulina no grupo submetido à ovariectomia durante 7 dias, fato que não refletiu em alterações na glicemia de jejum como sugerido por Ahmed-Sorou e Bayley (1981). Por outro lado, no grupo ovariectomizado durante 15 dias, observou-se redução na área sob a curva, como descrito no GTT, indicativo de uma maior secreção de insulina, mesmo assim, não foram observadas alterações glicêmicas de jejum, portanto, acredita-se que por se tratar de um sistema cuja ação é integrada, há uma regulação fina entre a concentração circulante de insulina com a população de receptores de tecidos-alvo, o que nos leva a sugerir que o estrógeno tem seu

*locus* da ação somente enquanto modulador e não agente primário no processo integrado do controle glicêmico, atuando tanto nas áreas hipotalâmicas, no controle central da atividade do pâncreas endócrino e na célula  $\beta$  pancreática (Shimazu e Ishikawa, 1981).

Observou-se que, na transição do 7º para o 15º dia, tanto frente ao efeito hipoestrogênico gerado pela ovariectomia quanto pela suplementação com o  $17\beta$ -estradiol, ocorreram expressivas mudanças nas responsabilidades indicadas por comportamentos distintos do GTT e do ITT. Uma explicação para isto reside no fato do estrógeno ser um agente regulador das atividades do pâncreas endócrino e também na sensibilidade da rede de tecidos insulino-sensíveis (Choi et al., 2005).

Estudos relacionados à fisiologia da insulina identificaram que o processo secretório é deflagrado por uma seqüência de eventos iniciados pelo metabolismo da glicose e/ou de outros nutrientes ou ainda modificada por vários fármacos. Uma das formas de ativação do processo secretório envolve a mudança do estado elétrico das células  $\beta$ . O potencial de repouso da célula  $\beta$  é principalmente determinado pela atividade dos canais de potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina [ATP ( $K_{ATP}$ )]. Quando há um aumento na concentração de glicose plasmática, aumenta a captação de glicose pela célula  $\beta$  e seu metabolismo é estimulado, aumentando a geração de ATP e, conseqüentemente, a relação ATP/ADP, levando ao fechamento de canais sensíveis ao ATP (designados canais  $K_{ATP}$ ) causando a despolarização da membrana. Isto resulta na ativação dos canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem e no início de uma atividade elétrica rítmica, típica na forma de *bursts*. O aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  induz elevação da calcemia citoplasmática e

conseqüente extrusão dos grânulos de insulina (Gembal et al., 1993; Aschroft, 2003; Koster, Permutt e Nichols, 2005).

Tem sido descrito que há uma ação insulínica não genômica desencadeada pela ligação do estrógeno ao receptor nas células  $\beta$  pancreáticas, gerando um segundo mensageiro ainda desconhecido o qual tem a capacidade de induzir o fechamento dos canais  $K_{ATP}$ , desencadeando atividade elétrica e promovendo a secreção de insulina de maneira similar à glicose. Cabe considerar, que a potência de ação segue a seguinte hierarquia:  $17\beta$  estradiol = estrona >  $\alpha$ estradiol > testosterona > estriol (Nadal et al., 1998).

Diversos estudos ligados à identificação das ações insulínicas do estrógeno, demonstraram alterações na transcrição do sinal após acoplamento, ativação da unidade receptora de insulina (IRS2) e a formação do AMPcíclico, com isso elevando a responsividade da célula  $\beta$  à sobrecarga de glicose de maneira similar ao exercício físico. Por esta razão, tem sido aventada a utilização deste agente enquanto coadjuvante no tratamento de mulheres diabéticas menopausadas (Borissova et al., 2001; Choi et al., 2005).

### **6.3 Relação entre conteúdo glicogênico, ovariectomia e estradiol**

A eficiência do processo contrátil depende de características anátomo-bioquímicas de cada tipo de fibra muscular, sendo consenso que o músculo esquelético utiliza preferencialmente a glicose como substrato energético. Nas fibras musculares, a captação da hexose se faz através de isoformas de transportadores sensíveis ou não à insulina, cuja função é translocar a glicose do meio extracelular para o citosol. A regulação da

captação de glicose ocorre de maneira multifatorial, dependendo da presença da insulina, da atividade metabólica tecidual ou ainda da atividade contrátil das fibras (Klip e Paquet, 1990). Após ser captada, 70 a 85 % da glicose fica reservada na forma de glicogênio, reserva relacionada diretamente à capacidade aeróbia ou à capacidade de *endurance* do organismo, de forma que as alterações no perfil enzimático das mitocôndrias e das reservas glicogênicas são os responsáveis pela eficiência do trabalho muscular (Keley, Reilly e Veneman, 1990; Taylor, 1991).

A importância da insulina para o equilíbrio nutricional do músculo, se deve à capacidade de promover a translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) de reservatórios citosólicos para a membrana, elevando a captação de glicose, oxidação ou direcionamento para formação de glicogênio (Henriksen et al., 1997).

Ao avaliar o conteúdo muscular de glicogênio, observamos que não houve diferença nas reservas nos 7 primeiros dias pós-ovariectomia, no entanto, após 15 dias, a diminuição nas reservas foi significativa. A explicação para este fato está centrada na participação dos hormônios ovarianos na regulação da homeostasia glicêmica e retrata nossos experimentos, onde demonstramos mudanças expressivas tanto na sensibilidade das células  $\beta$  pancreáticas (representado no GTT) quanto na sensibilidade tecidual à insulina (representado no ITT), somente após 15 dias da cirurgia, sugerindo que lenta e progressivamente ocorrem os processos de ajuste da integração funcional, onde o estrógeno passa a influenciar na homeostasia glicêmica indiretamente, modulando a secreção de insulina e a população de receptores dos tecido-alvo (Burt-Pichat et al., 2004).



Os resultados mostraram que o quadro de resistência à insulina também pode ser deflagrado pela ovariectomia, comprometendo diversos passos do metabolismo dos carboidratos, em especial, a formação das reservas glicogênicas (Kumagai, Holgman e Bjorntorp, 1993; Park et al., 2001; Song et al., 2005). Cabe ressaltar, que a dose utilizada mostrou-se efetiva, uma vez que, tem sido descrito que altas doses comprometem a sensibilidade à insulina enquanto pequenas doses melhoram, fato direcionado a ação molecular do estrógeno, uma vez que, altas doses hormonais promovem baixa expressão gênica do receptor de insulina bem como redução na fosforilação deste, instigando o desenvolvimento de estudos que avaliem a utilização do  $17\beta$ -estradiol em diferentes condições que causem resistência à insulina, como no caso do diabetes *mellitus* (Gonzalez et al., 2002).

Frente à sugestão de ação insulínica do estrógeno, passou-se a avaliar o comportamento das reservas de glicogênio em um grupo suplementado com o  $17\beta$ -estradiol e observamos que o tratamento promoveu elevação no conteúdo de glicogênio levando à formação de reservas progressivamente maiores concomitante ao tempo de tratamento, indicando que o estradiol tem a capacidade de ativar a enzima glicogênio sintetase (Becket et al., 2002; Gonzalez et al., 2002).

Um outro fato a se destacar, é que o músculo esquelético apresenta receptores de estrógeno sendo identificado em camundongo, rato, boi e em humanos (Couse et al., 1997; Pfaffl et al., 2001; Lemoine, Granier e Tiffoche, 2002, 2003).

Ao avaliar o conteúdo glicogênico do grupo ovariectomizado suplementado com estrógeno, verificou-se reservas significativamente maiores,

se comparado ao grupo não tratado. Este aumento nas reservas glicogênicas se deve à ação do  $17\beta$ -estradiol em promover aumento na sensibilidade à insulina, translocação de transportadores de glicose GLUT4 potencializando a captação da hexose, ativação das vias ligadas à ação insulínica, principalmente com relação à enzima glicogênio sintetase, convergindo para a formação das reservas de glicogênio (Campbell e Febraio, 2001; McClun et al., 2006).

Atualmente, não se conhece todos os passos ligados ao mecanismo de ação do estrógeno devido a seu caráter multifatorial, entretanto, buscou-se enumerar os eventos que podem ser ativados na sinalização estrogênica. Inicialmente tem sido descrito que o estrógeno ao se acoplar ao receptor é internalizado, após passar por dimerização no citoplasma, onde é deslocado até o núcleo ligado à proteína HSP90 onde a molécula se liga a dois domínios de transcrição denominados AF-1 e AF-2, localizados, respectivamente, nas regiões NH<sub>2</sub> e COOH do receptor, ativando uma série de fatores como a unidade gênica denominada de Sp1, o complexo AP-1 ligado a complexos protéicos denominados JUN/Fos, a transcrição e expressão gênica (Jakacka et al., 2001; McClun et al., 2006).

Um segundo mecanismo está ligado à ativação de vias citosólicas comuns entre o estradiol e a insulina, envolvendo a ativação seqüencial de segundos mensageiros que atuam nas vias enzimáticas denominadas de Src, PI-3K, Stats, ras, raf, proteína quinase ativada por mitógenos (Mek, Mepk), cada qual com especificidade de ação ligada ao metabolismo dos carboidratos exercendo, ação anabólica e/ou anti-catabólica (Migliaccio et al., 1998; Simoncini et al., 2000; Wise et al., 2001; Bjornstrom e Sjoberg, 2002; Patrone et al., 2006).

Uma terceira hipótese está ligada à capacidade do estrógeno em ativar a enzima óxido nítrico sintetase  $\text{Ca}^{2+}$  dependente nos músculos, uma vez que, esta enzima está envolvida nos processos que determinam o aumento na captação de aminoácidos e glicose, ativando as vias que levam à formação de reservas energéticas, como já descrito em humanos e ratos (Etgen, Fryburg e Gibbs, 1997).

Uma quarta via de ação sugerida, é a via indireta onde o estrógeno *per se* ou na suplementação induz *down-regulation* no eixo GH/IGF-1 afetando o músculo, uma vez que, após ovariectomia, observa-se elevação na secreção do GH e IGF1 que exercem ação anabólica e anti-catabólica (Fischer, Hasser e Brown, 1998).

A *performance* muscular é um importante determinante da capacidade funcional da musculatura esquelética, assim, estudos da integração funcional entre a molécula da insulina e o estradiol, reforçam a importância do estradiol para o equilíbrio energético das fibras musculares, uma vez que, tem sido relatado redução na força muscular em mulheres menopausadas (Sillence, Reich e Thomson, 1995; Skelton et al., 1999; Patrone et al., 2006). Tal suplementação pode propiciar uma melhora na qualidade de vida, fazendo da terapia de suplementação estrogênica um método eficaz na manutenção da força muscular, trazendo benefícios cardiovasculares, metabólicos e músculo esqueléticos, prevenindo o desenvolvimento de patologias que constantemente acometem mulheres menopausadas (Sirola e Rikkonen, 2005).

Tendo em vista os efeitos da reposição hormonal serem tão importantes e já demonstrados, a opinião mais corrente entre os especialistas é que toda a mulher na menopausa que apresente: 1. Sintomas clínicos

evidentes de déficit hormonal; 2. Risco de osteoporose (branca, magras, sedentárias) ou 3. Risco de doença cardiovascular (hipercolesterolemia, hipertensão arterial, fumo, diabetes, obesidade e história familiar de doença cardiovascular precoce) e que não tenha risco aparente de desenvolver câncer de mama (ausência de familiares diretos com doença comprovada) ou complicações tromboembólicas deve ser considerada como potencial candidata à TRH. Nas demais, deve-se pesar criteriosamente os riscos e benefícios para a instituição do tratamento (Almeida e Rodrigues, 2005).

#### **6.4 Relações funcionais entre desnervação neuromuscular e o estradiol**

A eficiência do processo contrátil da musculatura esquelética depende da atividade dos neurônios motores, que ao se interiorizarem no músculo, perdem a bainha de mielina ramificando e entrando em contato com a membrana da fibra através da placa motora, assim o sistema contrátil necessita da integridade de suas estruturas para o perfeito funcionamento. Uma consideração importante está ligada ao fato do músculo esquelético de rato possuir 3 tipos distintos de fibras que apresentam sensibilidade e responsividade à insulina diferenciadas, obedecendo a divisão em fibras I (vermelhas e lentas), fibras tipo IIa (vermelhas e rápidas) e fibras IIb (brancas e rápidas). Dentre elas, em condição de repouso, as fibras tipo I expressam a maior sensibilidade à insulina e o maior número de transportadores de glicose (Mc Dermot et al., 1990).

Ao avaliar o conteúdo de glicogênio dos músculos desnervados durante 7 dias, observamos que houve uma expressiva redução das reservas

do músculo sóleo, que é composto preferencialmente de fibras tipo I, não sendo expressiva a mudança nos demais músculos. Assim, o comprometimento na formação desta reserva energética decorre, em parte, de alterações nos mecanismos internos da cascata de reações quimio-enzimáticas que culminam com a translocação da isoforma de transportadores de glicose GLUT 4 de reservatórios citosólicos em direção à membrana e ativação do sistema sinalizador insulínico (Burant et al., 1991). O sequenciamento do DNA, que codifica a replicação do transportador GLUT4, mostrou 96% de identidade entre as seqüências observadas no homem, rato e camundongos. Esta hegemonia mostra que resultados experimentais observados em ratos são plausíveis de se observar em humanos (Bertelli et al., 2003).

A incorporação de novas moléculas de glicose nos reservatórios de glicogênio, o conteúdo citosólico da enzima glicose-6-fosfato e a atividade da enzima glicogênio sintetase, são etapas que tem um papel fundamental no metabolismo da glicose no tecido muscular. Segundo Wallis et al. (1999), no músculo desnervado há diminuição na atividade da enzima glicogênio sintetase concomitante à elevação na atividade da enzima glicogênio fosforilase, evento que ocorre em menor ou maior grau dependendo do tipo de fibra avaliado. Neste caso, o músculo sóleo foi o que apresentou o efeito mais significativo, corroborando com estudos que demonstraram que após 7 dias de desnervação, a captação de glicose é diminuída (Turinsk,1987; Turinsky e Damrau-Abney, 1998; Wallis et al., 1999; Hirose et al., 2001; Nunes e Mello, 2005).

Como estratégia bioquímica da musculatura desnervada, considera-se que há elevação na população do transportador de glicose GLUT1, na

expectativa de melhorar a captação da hexose e restabelecer o aporte do principal substrato energético metabolizável, no entanto, esta estratégia bioquímica não é totalmente efetiva, uma vez que, concomitante à desnervação ocorrem mudanças bioquímicas, que incluem variação na concentração e na atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na fosforilação, aumento na concentração de AMPc da proteína quinase dependente de AMPc e da atividade da adenilciclase, redução da atividade da enzima glicogênio sintetase e elevação na atividade da enzima glicogênio fosforilase (Frostick, 1995; Wallis et al., 1999; Bosch, Ziechen e Skutek, 2003) fatores associados que reiteram as pequenas reservas glicogênicas observadas neste estudo.

Ressaltando a importância da integridade da inervação motora para a homeostasia das fibras musculares, observa-se que o músculo sóleo submetido à desnervação apresentou redução no peso reforçando o comprometimento na sensibilidade à insulina e o desenvolvimento de hipotrofia. Esta hipotrofia é decorrente de um processo multifatorial afetando a atividade metabólica, a capacidade de absorver inúmeros substratos energéticos que dependem e estão associados à sensibilidade à insulina e redução no processo contrátil, uma vez que gera paralisia, fraqueza muscular e perda de massa (Hunter et al., 2002).

Sabe-se que o músculo esquelético tem papel essencial na manutenção da homeostase glicêmica (Wallberg-Henriksson, 1987). Uma vez constatado as alterações metabólicas induzidas pela desnervação, passamos a avaliar o efeito da desnervação sobre a taxa de remoção da glicose sanguínea ( $K_{ITT}$ ). Neste estudo foi demonstrado que a velocidade de decaimento da glicose reduziu concomitante à desnervação. É sabido que, a insulina sinaliza

através de sub-unidades denominadas substratos do receptor de insulina ou IRS, as quais se subdividem em unidades numeradas de 1 a 4, e por meio de reações em cascata fosforilam a proteína G ativando a fosfolipase C "ras" e a forma PI3-K ou fosfatidilinositol-3-quinase (Di Guglielmo et al., 1998). A enzima PI3-K atua como regulador alostérico, ligando-se à região denominada de *pleckstrin homology* (PH) de proteínas quinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK) e a proteína quinase B (PKB) (White e Gasiewick, 1993). Por meio destes mecanismos, a PI3-kinase é capaz de atuar no âmbito molecular, modulando vários processos metabólicos relacionados ao efeito da insulina, incluindo a captação de glicose, efeito anti-lipólise, síntese de glicogênio e supressão da gliconeogênese hepática através da regulação na expressão da PEPCCK ou enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Cortright e Dohm, 1997; Ogawa et al., 1998; Bertelli et al., 2003). Assim, concomitante à desnervação, as vias sinalizadoras da insulina são inativadas, reduzindo a eficiência da via pós-receptor, o que leva à redução na sensibilidade tecidual implantando o quadro de resistência (Wallis et al., 1999; Lin et al., 2002).

Dentro da proposta experimental, avaliou-se o efeito do tratamento com  $17\beta$ -estradiol na musculatura desnervada e observamos que as reservas glicogênicas foram expressivamente maiores quando comparadas aos músculos tratados com os não tratados e ainda, o conteúdo de glicogênio tornou-se progressivamente maior concomitante ao tempo de tratamento demonstrando o *status quo* das fibras musculares. Este dado mostra a ação do estradiol no restabelecimento das vias metabólicas comprometidas pela desnervação muscular, com ênfase especial na capacidade de ativar as etapas da sinalização insulínica, cuja eficácia foi comprometida pela desnervação.

Assim ao ativar a enzima glicogênio sintetase, restabelece-se parcialmente as condições energéticas das fibras musculares (Gonzalez et al., 2002).

Como considerações finais, queremos ressaltar que os receptores ER $\alpha$  estão presentes em tecidos cuja geração de energia decorre de metabolismo oxidativo mitocondrial, como coração, tecido adiposo e músculo, cuja ação está relacionada ao coativador de transcrição PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$* ) e o coativador 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), reguladores do metabolismo energético, incluindo ácidos graxos e atividade mitocondrial (Giguere et al., 1988; Sladek, Bader e Giguere, 1997; Huss, Levy e Kelly, 2001; Wiik et al., 2003; Glenmark et al., 2004).

Assim, hormônios com ação metabotrófica como o estrógeno podem ser substâncias-chave no restabelecimento das condições energéticas de músculos desnervados, fenômeno este pouco explorado na literatura; Caracterizando assim a importância deste estudo.

Os eventos decorrentes da desnervação neuromuscular são vários e desencadeados sequencialmente à lesão. A avaliação do comportamento bioquímico das fibras musculares desnervadas é área de interesse de diversos cientistas, no entanto, deve-se ter uma atenção especial com relação ao estrógeno, tendo em vista sua ação moduladora nas dinâmicas energéticas. Este conjunto de informações faz parte do contexto deste trabalho, o qual busca ressaltar o papel do estrógeno no restabelecimento de um perfil essencial para a eficiência contrátil, condição **si ne qua non** para a interface da reabilitação no campo da fisioterapia.



## **6.5 O efeito do estradiol, da ovariectomia e da desnervação sobre a análise morfométrica do músculo sóleo**

As miofibras, elementos contráteis do músculo esquelético são envoltos por uma membrana, o sarcolema, que é praticamente impermeável ao fluido extracelular. O sarcolema tem uma lâmina basal associada externamente que é idêntica em sua aparência estrutural ao envoltório ao redor de células de músculo liso e a lâmina basal que separa as células epiteliais do tecido conjuntivo adjacente, como visto pela microscopia eletrônica de transmissão. O termo “lâmina basal” foi definido antes que a ultraestrutura e as propriedades das membranas das células fossem conhecidas. Os principais componentes da lâmina basal são: o colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanas ricas em sulfato de heparina. A lâmina basal oferece apoio estrutural para as miofibras e é importante na manutenção e na integridade fisiológica das miofibras, além de servir como uma barreira seletiva aos eletrólitos, exercendo um papel importante na reparação da fibra muscular após lesão ou exercício físico excessivo (Carmelli et al., 2003).

Na última década, a metalloproteinases (MMPs) da matriz tem se mostrado um papel importante na matriz extracelular numa ampla gama de tecidos normais e patológicos, embora se conheça pouco de seu papel no músculo. O discernimento dos mecanismos de degradação de proteínas induzidos pela MMPs podem indicar estratégias terapêuticas preventivas e potentes no retardo da deterioração estrutural e fisiológica do músculo esquelético como ocorre no envelhecimento e em várias patologias (Carmelli et al., 2003).

As metalloproteinases da matriz constituem uma importante família de enzimas onde foram encontradas em plantas, vertebrados e invertebrados e muitas tem sido clonadas e seqüenciadas (Massava et al., 1998). Elas são enzimas proteolíticas altamente homogênea da matriz extracelular, sendo responsáveis pela degeneração do tecido conjuntivo e são encontradas na maioria dos tecidos (Balcerzak et al., 2001). Conjuntamente, são responsáveis pela degradação da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário, migração celular, morfogênese e remodelagem do tecido, exercendo um papel essencial no funcionamento normal em muitos tecidos durante o crescimento e envelhecimento e estão envolvidos em outros processos, tais como: remodelação do osso, funcionamento das glândulas mamárias, útero, além da ovulação. Também estão envolvidas em processos patológicos abordando a matriz extracelular, incluindo inflamação, angiogênese, invasão celular, doenças renais, progressão de tumor, metástase e morte celular. Elas são comumente induzidas por citocinas e secretadas por células inflamatórias (Choi e Dalakas, 2000). A ativação de promotores de MMPs envolvem a proteína quinase ativada por mitogeno (MAPK) mostrando as vias que podem ser ativadas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a IL-1 ou interleucina 1 (Mengshol, Mix e Brinckerhoff, 2002).

A matriz extracelular é composta por duas classes de macromoléculas, o colágeno e os polissacarídeos glicosaminoglicanas. Em várias partes do corpo, existem diferentes tipos de colágenos, sendo que a expressão das subfamílias de colágeno depende da idade e do balanço do esteróide hormonal, como por exemplo, o 17  $\beta$ -Estradiol, que estimula a produção de colágeno nos fibroblastos teciduais e aumenta a produção de

glicosaminoglicanas. Ambos os estrógenos, estradiol e estriol aumentam a síntese de colágeno e a produção de mucopolissacarídeos (Grosman, Hirdberg e Schon, 1971; Gruber et al., 2002).

O balanço da síntese e degradação do colágeno é importante, sendo que a degradação depende da atividade de várias proteinases incluindo a metaloproteinases da matriz (MMPs) e a catepsina, secretada pela célula do tecido conjuntivo. As MMPs são estocadas nos lisossomas como pro-colágenos e são continuamente secretadas para a matriz extracelular até a estimulação do ativador pró-colágeno endógenos. Há também as metaloproteinases inibidoras, conhecidas como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que controlam a atividade das MMPs (Simon, Gimeno e Mercader, 1996).

Hormônios ovarianos (esteróides ovarianos) interferem na ação dos TIMPs, e tem sido mostrado que, especialmente a progesterona, afeta a translocação e estabilização dos RNAm dos TIMPs (Sato, Ito e Mori, 1991). Quando aumentam os níveis plasmáticos de progesterona, tanto a degradação quanto a síntese (*turnover*) do colágeno estão baixos. Isto é devido ao fato da progesterona inibir a síntese de colágeno e suprimir a transcrição do fator nuclear kappa B (NFkB) (Van der Burg e Van der Saag, 1996). No estudo de Formosa et al. (1994), o tratamento com estradiol tópico estimulou a síntese de colágeno, com aumento do pró-colágeno tipo I e tipo III.

A atuação do estrógeno na substância fundamental amorfa se dá através dos nucleotídeos cíclicos, estimulando a proliferação dos fibroblastos e influenciando o *turnover* das macromoléculas, provocando alteração das glicosaminoglicanas e do colágeno. O aumento e hiperpolimerização do ácido

hialurônico causa aumento da pressão osmótica intersticial e edema. A alteração do colágeno favorece a fibroesclerose dos septos conjuntivos interlobulares (Isidor, 1984).

Essas observações mostram que os hormônios ovarianos são importantes na atividade das metaloproteinases da matriz extracelular, destacando os resultados desse trabalho, sendo que no grupo tratado com estradiol durante 7 dias, houve um aumento de 80,4% no tecido conjuntivo, corroborando com a literatura. Já no grupo ovariectomizado por 7 dias, onde ocorre a diminuição dos hormônios ovarianos, houve um aumento expressivo de 259,4% no tecido conjuntivo, sugerindo que a falta dos hormônios interfere na regulação (balanço) entre a síntese e a degradação do colágeno.

Porém, quando o estradiol foi administrado no grupo ovariectomizado, houve redução na proliferação do tecido conjuntivo, resultado importante para a integridade muscular. Esse fato mostrou a importância do estradiol, potencializando a ação fisiológica na degradação do tecido conjuntivo e assim, protegendo a musculatura esquelética de uma possível fibrose muscular, fato que interfere principalmente na eficiência atividade contrátil. Ressalta-se, que o mecanismo do estradiol no músculo esquelético não tem sido abordado na literatura, merecendo assim estudos mais aprimorados, envolvendo, por exemplo, a atividade tanto das metaloproteinases quanto dos inibidores, além da possível relação com as interleucinas relacionadas às metaloproteinases. Vale destacar que, como foi observado acima, no estudo de Van der Burg e Van der Saag (1996), a progesterona inibe a síntese de colágeno, assim pode-se sugerir que o tratamento com estradiol nos grupos desnervado e ovariectomizado, onde promoveu uma redução na proliferação

de tecido conjuntivo, pode ter sido um efeito “progesterona like” devido à similaridade da estrutura molecular, auxiliando na inibição da síntese do colágeno nesses períodos.

É importante destacar também a importância da dose e do tempo de tratamento com estradiol, sendo que nesse estudo foi utilizada alta dose em um curto período. Isso é relevante, pois no estudo de Demestre et al. (2005) observou-se que as MMPs no músculo estão envolvidas em mudanças no tecido após a desnervação e sugere-se que experimentos adicionais sejam necessários para afirmar a hipótese de que a inibição da MMPs pode ser benéfica na proteção do músculo contra uma remodelagem excessiva após a desnervação e portanto melhorar a regeneração.

Apesar da literatura abordar a relação dos hormônios ovarianos com as metaloproteinases em outros tecidos, como osso (Li et al., 2004), mama (Nilsson et al. (2001), útero (Anuradha e Thampan, 1993), coração (Chancey et al., 2005) e cartilagem articular (Oestegaard et al., 2006), não há estudos que abordem a relação dos hormônios, especialmente o estrógeno, com o músculo esquelético, merecendo assim, estudos adicionais de biologia molecular e histológicos para entender melhor os mecanismos e assim, os resultados encontrados nesse estudo.

Um tecido bastante estudado na literatura, relacionando o estrógeno às atividades das MMPs além da interferência da insulina, é a cartilagem articular. Classen et al. (2006) relataram que observações clínicas sugerem que existe uma relação entre osteoartrite e as mudanças do metabolismo do estrógeno na mulher menopausada, sendo que o colágeno tipo II é a proteína estrutural principal da matriz da cartilagem articular e sua síntese é aumentada

pela insulina na área de crescimento da cartilagem. Assim, a cartilagem de pacientes diabéticos é biomecanicamente menos estável, porém mais experimentos serão necessários para clarear o papel do estradiol e da insulina no metabolismo dos condrócitos articulares.

Nesse sentido, é importante lembrar que duas condições estudadas nessa dissertação foram a desnervação e a ovariectomia, que são caracterizadas por resistência à insulina, sendo a ovariectomia caracterizada também por hiperinsulinemia. Tal fato pode ter contribuído para o aumento do tecido conjuntivo, não somente pela diminuição dos hormônios ovarianos e a alteração na regulação da síntese/degradação do colágeno, possivelmente relacionado à progesterona, como já foi abordado anteriormente e sua relação com as MMPs, mas também pode estar relacionado com o hormônio insulina. Ressalta-se, que isso é uma sugestão, pois o estudo de Classen et al. (2005) abordou a cartilagem articular e não músculo esquelético, como foi demonstrado neste estudo. Assim, isso nos gera interesse em aprimoramento dos estudos relacionando esses aspectos também na musculatura esquelética, envolvendo não somente os hormônios ovarianos, mas também a insulina. Desta forma espera-se com este estudo estimular novas pesquisas para um melhor entendimento desse sistema.

Alguns estudos relataram que os parâmetros que deve-se considerar os principais componentes da matriz da cartilagem articular são o colágeno tipo II e proteoglicanas, sendo que a insulina aumenta a síntese de colágeno tipo II e os condrócitos da placa epifisal em cães (Mendler et al. 1989; Nataf et al., 1990). Classen et al. (2006) observaram, em condrócitos, que a síntese de colágeno tipo II foi aumentada pela insulina e não por doses fisiológicas de

estradiol, além da supressão do efeito da insulina quando foi administrado o estradiol. De forma contrária, no estudo de Nasatzky et al. (1993), a síntese de colágeno tipo II foi aumentada com estradiol em condrócitos da zona de crescimento de costelas de ratas. De acordo com Kevin et al (2001) pode-se concluir que o estrógeno parece influenciar a produção da matriz de condrócitos articulares, não de forma isolada, mas pela regulação de outros fatores.

Ainda com relação à insulina, a literatura destaca que o papel central no metabolismo de cartilagem articular pode ser atribuído à insulina devido a seu efeito estimulatório na síntese de colágeno tipo II, como principal componente estrutural deste tecido (Nataf et al., 1990).

Assim, apesar da literatura não abordar o efeito do estradiol e da insulina na matriz extracelular de músculo esquelético, além das atividades das MMPs, não podemos descartar no nosso estudo, a ação da insulina nos resultados da análise do tecido conjuntivo intramuscular, porém outros estudos devem ser realizados para elucidar o mecanismo exato dos resultados.

Com relação à cartilagem articular outros estudos também abordam a ovariectomia e a reposição hormonal. Oestergaard et al. (2006) avaliaram o efeito da ovariectomia e da terapia estrogênica na degradação do colágeno tipo II e na integridade estrutural desse tecido e observaram que a ovariectomia em ratas resulta na diminuição do nível sérico de estradiol e aumento do nível sérico do colágeno tipo II, o qual pode ser associado a alterações na sua estrutura e que a terapia precoce de estrógeno pode assegurar a preservação da integridade estrutural desse tecido em animais ovariectomizados, ressaltando que o efeito condroprotetor do estrógeno ocorre, pelo menos em

parte, através da inibição direta dos efeitos das atividades catabólicas dos condrócitos. Nesse estudo, os autores ainda sugerem que algumas mudanças ocorreram durante as três primeiras semanas de insuficiência de estrógeno, onde o atraso da terapia não pode ser compensado. Em outras palavras, o estrógeno pode prevenir a perda de cartilagem, mas não pode induzir a formação da mesma. Ainda ressaltaram, que o mecanismo pelo qual o estrógeno exerce seus efeitos ainda não é completamente entendido, no entanto, receptores de estrógeno têm sido demonstrados em inúmeras espécies de condrócitos, inclusive em ratas, sugerindo que os efeitos diretos poderiam estar também envolvidos na ação do estrógeno.

Na desnervação, além do comprometimento na homeostasia energética do músculo sóleo, concomitante ao processo de atrofia, há redução no metabolismo de glicose e aumento de colágeno tipo I e III no endomísio e perimísio, indicando que a atrofia por desnervação é acompanhada por alterações metabólicas e fibróticas (Józsa et al., 1990). A falta de forças fisiológicas atuando sobre o colágeno impede a formação de ligações cruzadas, dando origem às fibras imaturas que são responsáveis pela fibrose. Há também redução na área das fibras musculares, embora seu número se mantenha (Amiel et al., 1982). A perda de movimento contrátil do músculo pode alterar toda a arquitetura fibrosa do endomísio, indicando que a atrofia por desnervação é acompanhada por alterações fibróticas (Polacow et al., 2003). Essa fibrose pode estar associada à mudança no metabolismo de colágeno, pois sabe-se que há influência neural sobre a junção neuromuscular, como, por exemplo, o aumento do seu *turnover* após desnervação (Klein, Dawson e Kingsbury, 1997).



Com relação à densidade de área de tecido conjuntivo, alguns estudos relacionados a desuso muscular, como por exemplo, com órtese de resina acrílica na imobilização articular do tornozelo, promoveram aumento do tecido conjuntivo representado por 279% em 3 dias (Durigan et al., 2006), 200% em 7 dias (da Silva et al., 2006) e 160% em 15 dias (Durigan et al., 2006). Essa condição de desuso corrobora com os resultados deste estudo onde o grupo desnervado apresentou um aumento de 238,4%.

Embora relativamente pouco se conheça sobre o papel das MMPs no músculo esquelético, elas tem sido envolvidas numa gama de processos de desenvolvimentos funcionais e patológicos. As MMPs têm papéis regulatórios no crescimento e desenvolvimento do músculo e também são importantes no processo de reparo após lesão traumática ou miopatia por desuso. A atrofia muscular, decorrente de doenças ou imobilização de membros, é acompanhada por mudanças em ambas MMPs e TIMPs (Reznick et al., 2003).

Segundo Edwards et al. (1996), a família das metaloproteinases degradam todos os componentes da matriz extracelular, possuindo características semelhantes, incluindo um modo comum de ativação, conservação e seqüências de aminoácidos na suposta região do local ativo de ligação com metal e inibição por TIMPs. O nível de atividade final *in vivo* da atividade de degradação resulta das interações de muitos fatores que controlam a expressão e ativação de enzimas ativadoras e inibidoras, assim como a inatividade e degradação das mesmas, sendo que seu balanço determina a extensão da degradação da matriz.

Segundo Gatchalian, Schachner e Sanes (1989), o esmagamento ou axoniotomia dos nervos motores induz, respectivamente, a desnervação

transitória ou prolongada do músculo esquelético e, além disso, outras modificações resultam em mudanças expressivas na composição celular e nas moléculas do tecido conjuntivo da junção neuromuscular, incluindo acúmulo de células intersticiais principalmente fibroblastos, que produzem componentes da matriz extracelular. Estes eventos quer seja na junção neuromuscular ou no nervo requerem uma remodelagem extensiva da matriz extracelular que leva à recuperação das estruturas normais, implicando na proteólise dos componentes da matriz extracelular (O'Brien., Osteberg e Vrbova, 1984; Hantai, Rao e Festoff, 1988).

Ogawa et al. (2005) também observaram que a desnervação altera os espaços intersticiais entre as fibras musculares, sendo que as células mononucleadas são infiltrados nos espaços intersticiais das fibras musculares e a fibrose ocorre ocasionalmente no músculo. Estas descobertas sugerem que a interação entre a membrana da fibra muscular e as células infiltradas podem desempenhar um papel importante na degeneração ou na regeneração de músculo esquelético desnervado, porém, existem poucas informações sobre a interação entre a membrana da fibra muscular e as células infiltradas.

No estudo de Ogawa et al. (2005), foi ressaltada a osteoactivina como uma proteína-chave para regular as funções dos fibroblastos em músculo esquelético ativada na presença da desnervação. A análise imunohistoquímica em músculo esquelético atrofiado de rato por desnervação, revela que nessa condição aumenta a expressão da osteoactivina na membrana da fibra muscular, uma vez que a MMP-3 e a MMP-9 foram altamente expressadas nos fibroblastos adjacentes. Os autores ainda destacam que este estudo

fornece a primeira evidência de que osteoactivina é um novo ativador de fibroblasto em músculo esquelético desnervado.

Kherif et al (1998) observaram que a desnervação induz a expressão de MMPs, como as MMP-2 e MMP-9 em músculo esquelético, embora o mecanismo molecular da expressão MMP causada pela desnervação ainda seja desconhecida. Na fundamentação dessas descobertas, um aumento mediado pela osteoactivina em MMPs em músculos esqueléticos podem ser úteis na regeneração ou degeneração do músculo esquelético, levando à compensação pela perda de volume do músculo ou proteção das fibras musculares contra lesões após desnervação (Jabs et al., 1997; Lewis et al., 2000).

Nessa linha, Rich et al. (2003) relataram que a regulação das MMP-2 e MMP-9 durante a desnervação permitiram o crescimento dos fatores inibidores da camada basal das células de Schwann. Portanto, é provável que no sistema nervoso, a osteoactivina possa funcionar como um ativador para as células do tecido conjuntivo e facilitar a regulação dos neurônios pela secreção de MMP-3 e MMP-9 dos axônios nas proximidades das células de Schwann.

A MMP-2, por regular a integridade e a composição da matriz extracelular no músculo esquelético, tem papel essencial na proliferação da miofibra diferenciada e cicatrização da fibra após lesão e na manutenção de tecido conjuntivo subjacente. Além das miofibras, a matriz extracelular do tecido muscular esquelético contém fibroblastos, fibrócitos, macrófagos, endotélio vascular, nervos, adipócitos e várias células do sistema imunológico (Matrisian, 1992). Em tecidos normais, a MMP-2, MMP-7 e MMP-9 estão

imunolocalizadas em junção neuromuscular, em vasos e feixes de nervos (Schoser e Blottner, 1999).

O esmagamento do nervo ou axoniotomia são acompanhadas de remodelamento do nervo, do músculo e da junção neuromuscular (JNM). Além dessas mudanças, há um aumento do *turnover* de várias moléculas da matriz extracelular. Em músculo normal de ratos, a MMP-2 e a MMP-9 são localizadas na junção neuromuscular, em células de Schwann e no perineuro dos nervos intramusculares em músculo desnervado de ratos (Kherif et al., 1998).

Alguns estudos observaram que após a desnervação do músculo, as terminações nervosas retraem da placa motora final e se tornam envoltas por células de Schwann. O músculo sofre uma grande variedade de mudanças celulares e moleculares após a desnervação, sendo que a mais dramática é a atrofia. Os primeiros eventos envolvendo a superfície da célula do músculo incluem a perda das acetilcolinesterases (AChE) específica da placa motora e alterações na matriz extracelular ao redor da fibra muscular (Festoff et al., 1986; Kobayashi et al., 1997). Pouco se sabe sobre o envolvimento da matriz MMP no músculo seguido da desnervação. As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas que podem degradar componentes da matriz extracelular na JNM, incluindo laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e tenacina. As MMPs são secretadas por células presentes no músculo tais como as células de Schwann, axônios, células satélites do músculo e fibroblastos, porém existe um potencial para as MMPs estarem envolvidas nas mudanças celulares e estruturais no músculo induzidas pela desnervação (Muir, 1994; Yamada et al. 1995; Nordstrom et al., 1995; Guerin e Holland, 1995, Scott et al., 1998).

O estudo de Demestre et al. (2005) caracterizou a localização das MMPs, a ativação e a expressão do RNAm em músculo normal e desnervado no modelo de esmagamento a longo prazo, sendo que em músculo normal, as MMPs localizam-se uniformemente ao redor da fibra muscular. Outros estudos anteriores também localizaram MMPs na JNM, porém a atividade da MMPs e a expressão do RNAm foi quase indetectável. Isto sugere que, enquanto no músculo normal a proteína MMP está presente, as MMPs permanecem principalmente numa forma latente e seu *turnover* é baixo no desnervado (Kherif et al., 1998; Schoser e Blottner, 1999; Demestre et al., 2005).

Uma vez que as MMPs estão presentes na JNM, a regulação de suas atividades podem ser importantes na eficácia da reinervação, particularmente após a desnervação a longo prazo, onde mudanças degenerativas são mais evidentes (Finkelstein, Dooley e Luff, 1993). Um pequeno prisma da observação das MMPs imunohistoquimicamente dentro das fibras musculares podem também indicar a síntese de MMPs dentro das próprias fibras, além disso, células satélites musculares, fibroblastos, células de Schwann, capilares, nervos em degeneração e regeneração, e macrófagos mostraram que também produzem MMPs (Demestre et al. 1999; Hass et al., 2000; Hughes et al., 2002).

Nesse sentido, há evidências de que logo após a desnervação, as MMPs latentes são ativadas e podem portanto contribuir para mudanças degenerativas subseqüentes e perda da massa muscular associada à desnervação (Nihei e Monckton, 1980). Assim, Demestre et al. (2005) ressaltaram que, para testar a hipótese de que a inibição da atividade protease, particularmente das MMPs, após a desnervação do músculo irá promover a

manutenção da JNM e portanto facilitar a reinervação, exigirá estudos adicionais e experimentos mais detalhados.

## 7 CONCLUSÃO

O tratamento com  $17\beta$ -estradiol foi eficiente em minimizar a redução das reservas energéticas e a proliferação do tecido conjuntivo em músculos esqueléticos submetidos à desnervação e a ovariectomia, características importantes para a eficiência da contração muscular, que é o foco da fisioterapia como foi avaliado nas seguintes etapas de análise:

- 1) As reservas glicogênicas dos músculos do membro posterior de ratas controles, ovariectomizadas e desnervadas tratadas com  $17\beta$ -estradiol foram expressivamente maiores de acordo com o período de tratamento.
- 2) A citologia esfoliativa apresentou uma predominância de permanência em cada fase do ciclo estral, acompanhando a presença ou a redução do hormônio estrógeno.
- 3) No período estudado não houve mudança no índice de ingesta sólida e líquida das ratas controle, ovariectomizadas tratadas ou não com  $17\beta$ -estradiol.
- 4) Os pesos uterino e corporal, não apresentaram alterações, seja na condição de ovariectomia ou na suplementação com  $17\beta$ -estradiol.
- 5) Houve alteração na atividade pancreática à sobrecarga de glicose no grupo ovariectomizado 15 dias e nos grupos ovariectomizados tratados com estradiol durante 7 e 15 dias.
- 6) Quanto à resposta tecidual periférica à sobrecarga de insulina, houve alteração nos grupos tratados com  $17\beta$ -estradiol durante 7 e 15 dias, no grupo ovariectomizado 7 dias e nos grupos desnervados tanto 7 quanto 15 dias.

- 7) A densidade de tecido conjuntivo do músculo sóleo suplementado com  $17\beta$ -estradiol aumentou em relação ao controle. Quanto aos grupos desnervado e ovariectomizado sem tratamento com  $17\beta$ -estradiol por um período de 7 dias, foi observado aumento do tecido conjuntivo e redução da área, mas, quando tratado com estradiol observou-se uma redução da proliferação do tecido conjuntivo quando comparado ao respectivo grupo.



**ANEXO**

~~Ceccoti HM, Sousa, DD. Manual para normalização de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, UNIMEP; 2006. Disponível em <http://www.unimep.br/ppgft>~~



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propq@power.ufscar.br](mailto:propq@power.ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

## Parecer CEEA 010/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 7ª. Reunião, ocorrida em 20/06/2006, **APROVOU** o trabalho intitulado Perfil metabólico de ratas submetidas a diferentes condições de comprometimento muscular esquelético e o tratamento com estrógeno elaborado por Maria Theresa Munhoz Severi, Rommel Padovan Branquinho e Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, procedente da UNIMEP/Depto. de Fisioterapia. Protocolo CEEA nº 011/2006.

São Carlos, 30 de junho de 2006

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Aires MDM. Fisiologia. 2ª Edição; Guanabara Koogan; 1999.

Almeida FA e Rodrigues CIS. Revisão/ Aualização em hipertensão arterial. Terapia de Reposição Hormonal. J.Bras. Nefrol. 2005; 19(4): 443-438.

Amiel D, Woo SLY, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. Acta orthop scan 1982; 53: 325-332.

Andersen PH, Lund S, Schmitz O, Junker S, Kahn BB, Petersen, O. Increased insulin-stimulated glucose up-take in athletes: the importance of GLUT4 mRNA, GLUT protein and fibre type composition of skeletal muscle. Acta Physiol Scand. 1993; 149: 393-404.

Andesson DM, Marakovsky E, Billingsley WL, Dougali WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997; 390: 175-179.

Anuradha P, Thampan RV. Hormonal regulation of rat uterine collagenase. Arch Biochem Biophys. 1993; 303(1): 81-89.

Anzil AP, Werning, A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. J Neurocytol. 1989; 18: 833-45.

Aschroft GS, Milss SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, et al. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulation macrophage migration inhibitory factor. J Clin Invest. 2003; 111: 1309-1318.

Ashcroft, FM, Rorsman, P. Eletrophysiology of the pancreatic B-cell. Prog Biophys Mol Biol. 1989; 54: 87-143.

---

<sup>1</sup> Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Ahmed-Sorou H, Bayley CJ. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis, glycogen formation and gluconeogenesis. *Ann. Nutr Metab.* 1981; 25(4): 208-12.

Balcerzak D, Querengesser L, Dixon WT, Baracos VE. Coordinate expression of matrix degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *J Anim Sci.* 2001; 79: 94-107.

Becket T, Tchernof A, Toth MJ. Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. *Metabolism.* 2002; 51: 1397-1401.

Berne RM, Levy MN. *Fisiologia.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Bertelli DF, Ueno M, Amaral ME, Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, et al. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284(4): 679-687.

Bjornstrom L, Sjoberg M.. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol Endocrinol.* 2002; 16:2202–2214.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001; 294: 1704-1708.

Booth FW, Chakravarthy, MV, Spangenburg, EE. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *J Physiol.* 2002; 543:399-411.

Booth FW, Seider, MJ. Recovery of skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J Appl Physiol.* 1979; 47:974-977.

Borissova AM, Kovatcheva R, Shinkov A, Vukov M. A study of the psychological status and sexuality in middle-aged Bulgarian women: significance of the hormone replacement therapy (HRT). *Maturitas.* 2001; 39: 177-183.

Bosch U, Ziechen J, Skutek M. Arthrofibrosis in the result of a T-cell mediated immune response. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2001; 9: 282-289.

Brow M, Ferreira JA. Ovariectomy, hindlimb unweighting, and recovery effects on skeletal muscle in adult rats. *Aviat Space Environ Med.* 2005; 76:1112-1018.

Burant CF, Lemmon SK, Treutelaar MK, Buse, M.G. Insulin resistance of denervated rat muscle: a model for impaired receptor-function coupling. *American Journal Physiology.* 1984; 247(5 Pt 1):657-666.

Burt-Pichat B, Lafage-Proust MH, Duboeuf F, Laroche N, Itzstein C, Vico, L. et al. Dramatic decrease of innervation density in bone after ovariectomy. *Endocrinology.* 2004; 146(1):503–510.

Butcher RL, Pope RS. Role of Estrogen during Prolonged Estrous Cycles of the Rat on Subsequent Embryonic Death or Development. *Biology of Reproduction.* 1979; 21: 491-495.

Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA. Et al. Ovarian dysfunction in endometriosis associated and unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14: 554-557.

Campbell SE, Febbraio MA. Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. *Am J Physiol* 2001; 281:803-802.

Carmelli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve.* 2004; 29:191-197.

Carmeli E, Moas M, Abraham, MSC, Reznick, Z, Raymond, C. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerv.* 2003; 29: 191-197.

Chancey AL, Gardner JD, Murray DB, Brower GL, Janicki JS. Modulation of cardiac mast cell-mediated extracellular matrix degradation by estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(1): 316-321.

Childs TE, Spangenburg EE, Vyas DR, Booth FW. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285: 391–398.

Choi BC, Arnup JHG, Freeman MR. Nonequilibrium Domain Pattern Formation in Mesoscopic Magnetic Thin Film Elements Assisted by Thermally Excited Spin Fluctuations. *Phys Rev Lett.* 2005; 95 (23): 237211.

Choi YC, Dalakas MC . Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory miopathies. *Neurology*. 2000; 20: 927-933.

Ciocca, DR, Vargas-Roig, LM. Estrogen receptor in human nontarget tissue: biological and clinical implications. *Endocrine Rev*. 1995; 16: 35-62.

Clanssen, H, Schluter, M, Schunke, M, Kurz, B. Influence of 17  $\beta$ -estradiol and insulin on type II collagen and protein synthesis of articular chondrocytes. *Bone*. 2006; 39: 310-317.

Classen AK, Anderson KI, Marois E, Eaton S. Hexagonal packing of *Drosophila* wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. *Dev Cell*. 2005; 9: 805-817.

Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB. Et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol*. 1992; 131(4): 1821-1825.

Cortright RN, Dohm GL. (Mechanisms by which insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. *Can J Appl Physiol*. 1997;22:519-530.

Couse JF, Lindezey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology*. 1997; 138: 4613-4621.

Cowley SM, Hoare S, Mossolman S, Parker MG. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  form heterodimers on DNA. *J Biol Chem*. 1997; 272: 19858-19862.

Cushing BC, Wynne-Edwards KE. Estrogen receptor alpha distribution in male rodents is associated with social organization. *J Comp Neurol*. 2006; 494: 595-605.

Da Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006; 39: 979-85.

De Lacerda, CAM, Manual de quantificação morfológica:morfometria, alometria,esteriologia. 1994. 2 ed. CERBIO. Rio de Janeiro; 8-13.

Demestre M, Orthe M, Wells GM, Gearing AJ, Hughes RAC, Gregson NA. Characterization of matrix metalloproteinases in deservated muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005; 31: 545-555.

Demestre M, Wells GM, Miller KM, Smith KJ, Hughes RAC, Gegson NA. Characterisation of matrix metalloproteinase and the effects of a broad spectrum inhibitor (BB-1101) in peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 2004; 12: 767-769.

Demestre M, Gregson NA, Smith KJ, Miller KM, Gearing AJ, Hughes RAC. Effects of a matrix metalloproteinase inhibitor (BB-1101) on nerve regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 658-61.

Demestre M, Orthe, M, Wells, GM, Gearing, A.J, Hughes, RAC. Gregson. Characterization of matrix metalloproteinases in deservated muscle. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2005; 31: 545-555.

Di Guglielmo GM, Baass PC, Authier F, Posner BI, Bergeron JMJ. Insulin receptor internalization and signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1998; 182(1-2): 204-210.

Dionne IJ, Kinaman KA, Poehlman ET. Sarcopenia and muscle function during menopause and hormone-replacement therapy. *J Nutr Health Aging.* 2000; 4: 156-161.

Dupon C, Kim MH. Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione, and estradiol during the rat oestrous cycle. *J. Endocrinol.* 1973; 59:653-654.

Durigan JLQ, Cancelliero KM, Dias CNK, da Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da Imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: Análise metabólica e morfométrica. 2006.

Durigan JLQ, Cancelliero KM, Dias CNK, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: Análise metabólica e morfométricas. Ver

Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA et al. The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int J Obesity Relat Metab Disord.* 1996; 20:(Suppl3):9-15.

Elmendorf JS, Amrau-Abney A, Smith TR, David TSD, Turinsky J. Phosphatidylinositol 3-kinase and dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol.* 1997; 272(4 Pt 1): 661-670.

Etgen GJ, Fryburg DA, Gibbs EM. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes*. 1997; 46(11): 1915-19.

Feng X, Li G, Wang S. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle estrain injury and regeneration in females rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(11): 1489-94.

Fernandez HL, Duell MJ, Festoff BW. Neurotrophic control of 16S acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction. *J Neurobiol*. 1979; 10:441-54.

Festoff B, Rao JS, Hantai D. Plasminogen activators and inhibitors in the neuromuscular system: III. The serpin protease nexin I is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J Cell Physiol*. 1991; 174: 76-86.

Festoff BW, Hantai D, Soria J, Thomaidis A, Soria C. Plasminogen activator in mammalian skeletal muscle: characteristics of effect of denervation on urokinase-like and tissue activator. *J Cell Biol*. 1986; 103: 1415-21.

Finkelstein DI, Dooley PC, Luff AR. Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments. *Muscle Nerve*. 1993; 16: 769-77.

Fischer, JS, Hasser, EM, Brown, M. Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1998; 85: 1316-1321.

Flatt, JP. Importance of nutrient balance in body weight regulation. *Diabetes Metab Ver*. 1988; 4:571-581.

Formosa M, Brincat MP, Cardozo LD, Studd JWW. Collagen, the significance in skin, bones and bladder. In: Lobo RA. *Treatment of the Post-menopausal Woman. Basic and Clinical Aspects*. News York, Raven Press, 1994: 142-51.

Freeman, ME. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E., Neils J.. *Physiology of reproduction*. Raven Press Ltd. New York. 1988: 1893-1928.

Frostick SP. The physiological and metabolic consequences of muscle denervation. *Int Angiol*. 1995; 14(3): 278-87.

Garcia MT, Kanaan S. Bases moleculares da resistência à insulina. *J Brás Pathol*. 1997; 33 (3): 154 – 59.



Garret JR, Best TM. Anatomy, physiology, and mechanics of skeletal muscle; In Simon, SR. AAOS Orthopedics Basic Science. Chicago, AAOS Press. 1994; 89-125.

Gatchalian CL, Schachner M, Sanes JR. Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin (J1), N-CAM, fibronectin and a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol.* 1989; 108(5): 1873-90.

Gatchalian CL, Schachner M, Sanes J. Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin (j1), N-CAM, fibronectin, and Heparan Sulfate Proteoglycan. *J Cell Biol* 1989; 108:1879-90.

Gayles EC, Pagliassoti MJ, Prachr PA, Koppenhafer TA, Hill JO. Contribution of energy intake and tissue enzymatic profile to body weight gain in high-fat-fed rats. *Am J Physiol.* 1997; 41:188-194.

Gembal, M, Detimary, P, Gilon, P, Gao, ZY, Henquini, JC. Mechanism by which glucose can control insulin release independently from its action adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J Clin Invest.* 1993; 91(3): 871-870.

Giguere V, Yang N, Segui P, Evans RM. Identification of a new class of steroid hormone receptor. *Nature.* 1988; 331:91-94.

Glenmark B, Nilsson, M Gao, H Gustafsson, JA Dahlman-Wright, K Westblad, H. Difference in skeletal muscle function in males vs. female: role of estrogen receptor- $\beta$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 287: 1125-1131.

Gonzales C, Alonso A, Grueso NA, Diaz F, Esteban MM, Fernandez S, et al. Role of 17 $\beta$ -estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor. *Steroids.* 2002; 67(13-14): 993-1005.

Green S, Walter P, Kumo V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human estrogen receptor cDNA sequence expression and homology to V-erb-A. *Nature.* 1986; 320:134-139.

Grosman N, Hirdberg E, Schon J. The effect of oestrogenic treatment of the acidmucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol Toxicol* 1971;30:359-64

Gruber CJ, Wieser F, Gruber IML, Ferlitsch K, Gruber DM, Huber JC. Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecol Endocrinol*. 2002; 16: 431-441.

Guerin CW, Holland, PC. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteinases by human skeletal muscle satellite cells. *De Dyn*. 1995; 202 (1): 91-99.

Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24: 479-485.

Hantai D, Rao JS, Festoff BW. Serine proteases and serpins: their possible roles in the motor system. *Rev Neurol (Paris)* 1988; 144(84): 680-687.

Hass TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279:1540-1547.

Heikkinen JE, Kyllönmä E, Kurttila-Matelo G, Wilén-Rosenqvist KS, Lankinen H, Rita K, et al. HRT and exercise effects on bone density, muscle strength and lipid metabolism. A placebo-controlled 2 year prospective trial on two estrogen-progestin regimens in healthy postmenopausal women. *Maturitas*. 1997; 26: 139-149.

Henriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol*. 1997; 70(5): 2322-2327.

Herbst KL, Bhasin S. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7:271-277.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Ibebunjo C, Martyn JA, Ibebunjo C. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate 1-mediated insulin signaling in skeletal muscle. *Metabolism*. 2001; 50(2): 216-222.

Hoar, W, Hickman, CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: Hoar, W, Hickman, CP. *General and comparative physiology*. 2.ed. Prentice-hall. New Jersey, 1975: 260-265.

Hoffman, WW. Musculotrophic effects of insulin receptors before and later denervation. *Brain Res*. 1987; 401(2): 312-321.

Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness eveningness in human circadian rhythms. *Int. J Chronobiol.* 1976; 4: 97–110.

Hughes, PM, Wells, GM, Perry, VH, Brown, MC, Miller, KM. Comparison of matrix metalloproteinase expression during Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous systems. *Neuroscience.* 2002; 113: 273-87.

Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S et al. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *Journal of General Virology.* 2002; 83: 2897-2905.

Huss JM, Levy FH, Kelly DP. Hypoxia inhibits the PPAR $\alpha$ /RXR gene regulator pathways in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276: 27605-27612.

Huss JM, Tora IP, Staels B, Giguere, V, Kelly, D. Estrogen-related receptor  $\alpha$  directs peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 9079-9091.

Isidor F, Karring T, Attstrom R. Reproducibility of pocket depth and attachment level measurements when using a flexible splint. *Clin Periodontol.* 1984; 11:662-668.

Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K., Scheel D. Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 4800-4805.

Jakacka M, Weiss M, Chien PY, Gehm BD, Jensen JL. Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP-1 pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 13615-13621.

Jarvinen TAH, Józsa LO, Kannus P, Jarvinen TLN, Jarvine M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002; 23: 245-254.

Jensen, EV, Jacobsen, HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res.* 1962; 18: 387-414.

Jonhson MI. Acupuncture-like transcutaneous electrical nerve stimulation (A-TENS) in the management of pain. 1988. *Phy Ther Rev.* 3:73-93.

Józsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg.* 1990; 72b:293-297.

Junqueira, LC, Carneiro, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Kelley DE, Reilly JP, Veneman T. Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am J Physiol.* 1990; 258: 923-929.

Kherif S, Dehaupas, M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 309-319.

Klein L, Dawson MH, Kingsbury GH. Turnover of collagen in the adult rat after denervation. *Bone Joint Surg (Am)*.1997; 59:1965-1967.

Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes. Care.* 1990; 13: 228-243.

Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter, DA, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve* 1997; 20: 858-66.

Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channel (K<sub>ATP</sub>) connection. *Diabetes.* 2005; 54(11): 3065-3072.

Kow LM, Pfaff, DW. Estrogen effects on neuronal responsiveness to electrical and neurotransmitter stimulation: an in vitro study on the ventromedial nucleus of the hypothalamus., *Brain Res.* 1985; 11; 347(1):1-10.

Kwon S, Hartzema AG, Duncan PW, Min-Lai S.; Disability measures in stroke - Relationship among the Barthel Index, the Functional Independence Measure, and the Modified Rankin Scale. *Stroke.* 2004; 35(4): 918-923.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 1996; 138: 863-870.

Kuiper G, Gustafsson J. The novel estrogen receptor-beta-subtype potential role in the cell-and-promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *Fed Eur Biochem Soc Lett.* 1997; 410: 87-90.

Kumagai AS, Holmang A, Bjorntorp P. Effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats. *Acta Physiologica Scandinavica.* 1993; 149: 91-97.

Latour MG, Shinoda M, Lavoie, JM. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol.* 2001; 90:235-241.

Lemoine S, Granier P, Tiffocche C, Ronnou- Bekono F, Thieulant ML, Delamarche, P. Estrogen receptor alpha mRNA in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35: 439-443.

Lemoine S, Granier P, Tiffocche C. Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica.* 2002; 174: 283-289.

Lewis MP, Tippet HL, Sinanan AC, Morgan MJ, Hunt NP. Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the migratory phase of human and murine muscle cell cultures. *J Muscle Res Cell Motil.* 21: 223-233,2000.

Li Y, Foster W, Deasy BM, Cham Y, Prisk V, Tang Y. et al. Transforming growth factor-beta 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2004; 164: 2950-2966.

Lin Y, Brady MJ, Wolanske K, Holbert R, Ruderman NB, Yaney GC. Alterations of nPKC distribution, but not Akt/PKB activations in denervation rat soleus muscle. *Am J Physiol.* 2002; 318-325.

Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California.* 1922; .6 :1-148.

Machida, S, Booth, FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36: 52-59.

Magnusson C. et al. Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *Eur J Neurosci.* 2005; 21(2): 577-80.

Mandl AM. The phases of the oestrus cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*. 1951; 28:576-584.

Mangelsdorf JD, Thummel C, Beato, M Herrich, P, Shutz, G, Umesono, K. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995; 83: 835-839

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002; 62(4A): 609-614.

Marcondes KM, Miguel KJ, Melo, LL. Spadari-bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female ratis in the elevated plus-maze test. *Phys & Behav*. 2001; 74: 435-40.

Marcondes FK. Influence of the estrous cycle on the hormonal responses from female rats submitted to stress. Thesis PHD, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. 1998.

Massava I, KotraLP, Fridman R, Mobashery S. Matriz metalloproteinases: structure, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998; 12: 1075-1095.

Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*. 1981; 121(1): 75-88.

Matrisian LM. The Matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 1992; 14: 455-463.

McClellan MC, West NB, Tacha DE, Greene GL, Brenner RM. Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the macaque reproductive tract with monoclonal antiestrophilins. *Endocrinology*. 1984; 114:2002-2014

McClun JM, Davies JM, Wilson MA, Goldsmith EC, Carson, JA. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J Appl Physiol*. 2006; 100: 2012-2023.

McDermott EW, Barron ET, Smyth PP, O'Higgins NJ. 1990. Premorphological metabolic changes in human breast carcinogenesis. *Br J Surg*. 2006; 77(10):1179–1182.

McLaughlin J, Bosmann HB. Regulation of increased acid proteinases in denervated skeletal muscle. *Exp Neurol*. 1976; 50: 276-82.

Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol.* 1989; 108(1): 191-7.

Mengshol JA, Mix J, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritis diseases: bull's eye or missing the mark? *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 43-20.

Migliaccio A, Pilccolo D, Castoria G, Domenico M, Bilancio A, Lombardi, M. et al. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 1998; 17: 2008-2018.

Muir D. Metalloproteinase-dependent neurite outgrowth within a synthetic extracellular matrix is induced by nerve growth factor. *Exp Cell Res* 1994; 210:243-52.

Nadal, A, Rovira, JM, Laribi, O, Leon-Quinto, T, Andreu, E, Ripolil, C, Soria, B. Rapid insulinotropic effect of 17 $\beta$ -estradiol via plasma membrane receptor. *FASEB J.* 1998; 12: 1341-1348.

Nasatzky E, Schwartz Z, Boyan BD, Soskolne WA, Ornoy A. Sex-dependent effects of 17-beta-estradiol on chondrocyte differentiation in culture. *J Cell Physiol.* 1993; 154:359–367.

Nataf V, Tsagris L, Dumontier MF, Bonaventure J, Corvol M. Modulation of sulfated proteoglycan synthesis and collagen gene expression by chondrocytes grown in the presence of bFGF alone or combined with IGF1. *Reprod Nur Dev.* 1990; 30 (3):331-42.

Nihei T, Monckton G. A study of protein metabolism in denervation and reinnervation following sciatic nerve crush. *FESBS Lett .* 1980; 119: 275-8.

Nilson LO, Boman A, Grigelioniene G, Ohlsson C, Ritzen EM, Wroblewski JJ. Demonstration of estrogen receptor-B immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 370-373.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujaguem M, Thonsen J, Russon G, et al. Mechanism of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001; 81: 1535-1565.

Nordstrom LA, Lochner J, Yeung W, Ciment G. The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae. *Mol Cell Neurosci*. 1995; 6: 56-68.

Nunes WMS, Mello, MAR. Glucose Metabolism in rats submitted to skeletal muscle denervation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 48(4): 541-48.

O'Brien RAD, Osteberg AJC, Vrbova G. Protease inhibitors reduce the loss of nerve terminals induced by activity and calcium in developing rat soleus muscles in vitro. *Neuroscience*. 1984; 12: 637-46.

Ogawa T, Nikawa T, Furochi H, Kosyogi M, Hirasaka K, Suzue N, et al. Osteoactivin upregulates expression of mmp-3 and mmp-9 in fibroblasts infiltrated into denervated skeletal muscle in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289: 697-707.

Ogawa S, Inque S, Watanabe T, Orino A, Hosoi T, Ochi Y, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor  $\beta$ cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acid Res*. 1998; 26: 3505-3512.

Ostergaard S, Bodil CS, Hoegh-Andersen P, Henriksen K, Qvist P, Christiansen C, et al. Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type ii collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats. Implications of the time of initiation. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(8):2441-2451.

Park K et al. Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int J Impot Res*. 2001; 13: 116-124

Patrone C, Pollio G, Agratil P, Parker MG, Maggi A. Cross-coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells. *Mol Endocrinol*. 2006; 10: 499-507.

Petersson K, Grandien K, Kuiper GGJM, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor  $\beta$  forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol Endocrinol*. 1997; 11: 1486-1496.

Pfaffl MW, Lange IG, Daxenberger A, Meyer HHD. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptor (ER): quantification of ER $\alpha$  and ER $\beta$  m RNA with real time RT-PCR. *APMIS*. 2001; 109: 345-355.

Piccone CM, Brazeau GA, McCormick KM. Effect of oestrogen on myofibre size and myosin expression in growing rats. *Experimental Physiology*. 2005; 90(1): 87-93.



Poehlman ET, Toth MJ, Gardner AW. Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med.* 1995; 123: 673-675.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfométrico do músculo soleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica / Morphometric study of the denervated soleus muscle treated by association of metformin and electrostimulation. *Rev Bras Fisioter.* 2003; 7(1):77-84.

Purdie, DW, Beardsworth, SA. The selective oestrogen receptor modulation: evolution and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 48: 785-792.

Ramamani, A, Aruldas MM, Govindarajulu P. Differential response of rat skeletal muscle glycogen metabolism to testosterone and estradiol. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999; 77: 300-304.

Reznick AZ, Menashe O, Bar-Shai M, Coleman R, Carmeli E. Expression of matrix metalloproteinases, inhibitor, and acid phosphatase in muscle of immobilized hindlimbs of rats. *Muscle Nerve.* 2003; 27:51-59.

Rich JN, Shi Q, Hjelmeland M, Cummings TJ, Kuan CT, Bigner DD, et al. Bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model. *J Bio Chem.* 2003; 278: 15951-15957.

Rincon J, Holmang A, Wahlstrom EO, Lonroth P, Bjorntorp P, Zierath JR, et al. Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment. *Diabetes.* 1996; 45: 615-621.

Robertson DM, Ellis S, Foulds LM, Findlay JK & Bindon BM. Pituitary gonadotrophins in Booroola and control merino sheep. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1984; 71: 189-197.

Roubenoff R. Sarcopenia and its implications for the elderly. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54 (Suppl 3): 40-47.

Sakuma Y, Akaishi T. Cell size, projection path, and localization of estrogen-sensitive neurons in rats by airborne scent from estrous females. *Physiol Behav.* 1997; 62:921-924.

Sasa T, Sairyo K, Yoshida N, Ishikawa M, Fukunaga M. Effects of ovariectomy on intramuscular energy metabolism in young rats: How does sports-related-amenorrhea affect muscles of young female athletes? *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*. 2001; 220: 125-129.

Sato T, Ito A, Mori, Y. Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases by progesterone and Estradiol-17B. *Biochem J* 1991; 275: 645-50

Schoser BG, Blottner D. Matrix metalloproteinase MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle. *Neuroreport*. 1999; 10: 2795-7.

Schwartz S, Zhang Z, Frazer KA, Smit A, Riemer C, Bouck J. et al. PipMaker WebServer for Aligning Two Genomic DNA Sequences. *Genome Research*. 2000; 10(4): 577-586.

Scott KA, Wood EJ, Karran EH. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FEBS Lett*. 1998; 441:137-40.

Shimazu T, Ishikawa K. 1981 Modulation by the hypothalamus of glucagon and insulin secretion in rabbits: studies with electrical and chemical stimulations. *Endocrinology*. 1981;108(2):605-11.

Shulman RG, Bloch G, Rothman DL. In vivo regulation of muscle glycogen synthase and control of glycogen synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92: 8835-8452.

Sillence MN, Reich MM, Thomson BC. Sexual dimorphism in the growth response of entire and gonadectomized rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1995; 268: 1077-1082.

Silva CA, Guirro RRJ, Pollacow MLO, Cancelliero KM, Durigan, JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res*.. 2006; 39: 979-985.

Simocini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with a regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000; 407: 538-541.

Simon C, Gimeno MJ, Mercader A. Cytokines adhesion molecules – invasive proteinases. The missing paracrine/autocrine link in embryonic implantation. *Mo Hum Reprod* 1996; 2: 405-24

Sipila S, Taaffe DR, Cheng S, Puolakka J, Toivanen J, Suominen H. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin Sci (Lond)*. 2001; 101: 147–157.

Sirola J, Rikkonen T. Muscle performance after the menopause. *J Br Menopause Soc*. 2005; 11(2):45-50.

Sitnick M, Foley, AM, Brown, M, Spangenburg, EE. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol*. 2006; 100: 286-293.

Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970; 28(2): 234-236.

Skelton PA, Phillips SL, Bruce SA, Naylor CH, Wodegde, RC. Hormone replacement therapy increases isometric muscle strength of adductor pollicis in post-menopausal women. *Clin Sci*. 1999; 96: 357-364.

Sladek R, Bader JA, Giguere V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor  $\alpha$  is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme a dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol*. 1997; 17: 5400-5409.

Smith RL, Lawrence JC Jr. Insulin action in denervated rat hemidiaphragms. Decreased hormonal stimulation of glycogen synthesis involves both glycogen synthase and glucose transport. *J Biol Chem*. 1984; 259(4):2201–2207.

Song D, Arikawa E, Galipeu DM, Yeh JN, Battel ML, Violet, G, et al. Chronic Estrogen Treatment Modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. *Am J Hypertens*. 2005; 18(9): 1189-1194.

Sorensen MB, Rosenfalck AM, Hojgaard L, Ottesen B. Obesity and sarcopenia after menopause are reversed by sex hormone replacement therapy. *Obes Res*. 2001; 9: 622–626.

Sowell Mo, Borggs KP, Robinson KA, Dutton SL, Buse MG. Effects of insulin and phospholipase C in control and denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1991; 260(2 Pt 1):E247-56.

Srivastava AK, Pandey SK. Potential mechanism (s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem.* 1998; 182: 135 -141.

Taylor R. Insulin action. *Clin Endocrin.* 1991; 34:159-171.

Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalization of estrogen receptor beta in human tissue. *J Mol Endocrinol.* 2000; 24:145-155.

Tiidus, PM. Can estrogens diminish exercise induced muscle damage? *Can J Appl Physiol.* 1995; 20: 26-38.

Turinsk J. Dynamics of insulin resistance in denervated slow and fast muscles in vivo. *Am J Physiol.* 1987; 252(3Pt2):531-537.

Turinsky J, Damrau-Abney A. Akt1 kinase and dynamics of insulin resistance in denervated muscles in vivo. *Am J Physiol.* 1998; 275(5 pt2): 1425-1430.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990; 20;61(2):203-212.

Van der Burg B, Van der Saag PT. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interaction as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2:433-438.

Wallberg-Henriksson, H. Glucose transport into skeletal muscle. Influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. *Acta Physiology Scand.* 1987; 131(Suppl 564): 1-80.

Wallis MG, Appleby GJ, Youd JM, Clarck MG, Penschow JD. Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated hindlimb muscles of rats is related to muscle atrophy and fibre type. *Live Sciences.* 1999; 64(4): 221-228.

White TE, Gasiewicz, TA. The human estrogen receptor structural gene contains a DNA sequence that binds activated mouse and human Ah receptors: a possible mechanism of estrogen receptor regulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195: 956-962.

Wiik A, Ekman M, Morgan G, Johansson O, Jansson E, Esbjornsson M. Oestrogen receptor  $\beta$  is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol.* 2005; 124:161-165.

Wise PM, Dubal DB, Melinda E, Wilson ME, Rau SW. Minireview: Neuroprotective effects of estrogen – New insight into mechanisms of action. *Endocrinology.* 2001; 142: 969-973.

Yamada T, Yohiyama Y, Sato H, Seiki M, Shinagawa A, Takahashi M. White matter microglia produce membrane-type matrix metalloproteinase, an activator of gelatinase a in human brain tissues. *Acta Neuropathol.* 1995; 90: 421-424.

Yoneda T, Sato M, Maeda M, Takagi H. Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: Cloning of the fourth adenylate kinase. *Molecular Brain Research.* 1998; 62: 187–195.

Young WC, Boling JL, Blandau R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat Rec.* 1941; 80: 37-45.

Zieratch CR, Nolte LA, Wahlstrom E, Galuska D, Shepherd PR, Kahn BB. Et al. Carrier mediated fructose uptake significantly contributes to carbohydrate metabolism in human skeletal muscle. *Biochem J* 1995; 311: 517-521.

