



EDNA LOPES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
METABÓLICOS E COMPORTAMENTAIS EM
RATOS TRATADOS COM RACTOPAMINA E
SUBMETIDOS A ESTRESSE**

LAVRAS-MG

2012

EDNA LOPES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E
COMPORTAMENTAIS EM RATOS TRATADOS COM RACTOPAMINA E
SUBMETIDOS A ESTRESSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias, para a obtenção de título de Mestre.

Orientador

Dr. Luciano José Pereira

Coorientadores

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Lopes, Edna.

Avaliação de parâmetros metabólicos e comportamentais em ratos tratados com ractopamina e submetidos a estresse por imobilização / Edna Lopes. – Lavras : UFLA, 2012.

91 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luciano José Pereira.

Bibliografia.

1. Agonista β -adrenérgico. 2. Desempenho. 3. Metabolismo. 4. Teste do labirinto em cruz elevado. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08951

EDNA LOPES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E
COMPORTAMENTAIS EM RATOS TRATADOS COM RACTOPAMINA
E SUBMETIDOS A ESTRESSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de julho de 2012.

Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Dr. Alexandre Tourino Mendonça UNINCOR

Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha UFLA

Dr. Luciano José Pereira
Orientador

LAVRAS – MG

2012

Aos meus pais, Edson e Carmen.
Aos meus irmãos, Emerson e Juninho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realizar um sonho e por me conceder força em todos os momentos;

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, Departamento de Ciência dos Alimentos e Departamento de Zootecnia, por permitirem a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao professor e orientador Luciano, pela confiança, pelas oportunidades, por impulsionar o sucesso desse trabalho, e por todas as instruções que contribuíram para a minha carreira científica;

À professora e eterna orientadora Christiane, por todos esses anos de contribuição para meu amadurecimento profissional, e não menos importante, meu crescimento pessoal, agradeço não só pela parceria, mas também pelos conselhos e risadas;

Aos professores Raimundo e Márcio, pelo apoio importantíssimo, pelos ensinamentos e pelas oportunidades que me permitiram crescer não apenas no mestrado, como também durante toda vida acadêmica;

Às parceiras imprescindíveis nesse trabalho, Andressa e Mariana, pela dedicação e pelo apoio durante toda essa jornada. Ao Matheus, Júlia, Ariane, Bruno, e a todo grupo que participou dos mutirões que finalizaram cada ciclo desse trabalho, obrigada pela boa vontade e pelas contribuições;

Ao querido Willian, laboratorista do Setor de Fisiologia e Farmacologia/DMV, pela ajuda em todos os momentos, pelos ensinamentos e pela disponibilidade. Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa Animal/ DZO, Márcio e José Virgílio, pela assistência em todas as atividades cumpridas no setor;

À Jeruza, laboratorista do Setor de Patologia e ao professor Marcelo Henrique Napimoga, da Faculdade São Leopoldo Mandic, pela grandiosa contribuição para o enriquecimento dessa pesquisa;

Ao professor Renato Ribeiro Lima, do Departamento de Ciências Exatas, pela valiosa ajuda na realização dos testes estatísticos e pelos ensinamentos compartilhados;

Aos meus queridos pais, pelo amor incondicional, compreensão e paciência em todos os momentos; e aos meus amados irmãos Emerson e Juninho pela amizade e pelos laços eternos;

Agradeço também a toda minha família: tios e primos, a minha avó Luiza; e aos meus amigos de Barbacena, em especial, Samira, Bia e Vô Raimundo, muito obrigada por serem meu alicerce e por estarem sempre por perto, mesmo estando longe;

Às amigas de república: Amanda, Juliana e Natália; e as meninas do Matisse: Maysa, Priscila, Lígia, Fernanda e Loló; e à amiga Geninha, pela convivência deliciosa e pela companhia tanto nos momentos difíceis, como naqueles mais alegres;

À amiga Vivian, pelas infinitas ajudas, pelo companheirismo no setor de fisiologia e pela amizade maravilhosa;

Aos amigos do grupo de sanidade animal: Débora, Fernanda, Fábio, Jonata, Juliana e Marina, pela parceria nos trabalhos e nas infinitas risadas;

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A ractopamina (RAC) é um agonista β -adrenérgico utilizado na dieta animal como agente repartidor de nutrientes. Contudo, poucos estudos abordam o funcionamento bioquímico envolvido na ativação de receptores β -adrenérgicos e sua relação com o estresse e o comportamento animal. Assim, este estudo objetivou verificar o efeito da RAC sobre o metabolismo, desempenho, composição corporal e comportamento em modelo experimental de ratos *Wistar* tratados com RAC e submetidos a estresse. Os ratos foram distribuídos em 15 grupos experimentais (n=5). A dose oral de 5 ppm de RAC foi fornecida por períodos de 07, 14, 21 e 28 dias. Protocolos de estresse por imobilização aguda (1 hora por 1 único dia) e crônica (1 hora por dia /5 vezes por semana/ 40 dias) foram realizados. Os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (TLCE) para avaliação comportamental. Níveis de corticosterona e insulina foram determinados por ELISA. Níveis de colesterol total e frações, triacilglicerol, glicemia e características da carcaça e vísceras foram avaliados. A determinação de proteínas transportadoras de glicose dependentes de insulina (GLUT-4) foi realizada pelo método de *Western Blot* nos adipócitos epididimários. O delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x5 foi instituído. Os dados foram submetidos à Análise de Variância, e quando necessário, a comparação de médias pelos Testes SNK e Regressão. Para as variáveis relacionadas ao comportamento optou-se pelas Análises de *Deviance* considerando o Modelo Linear Generalizado. Os períodos de RAC associados ao estresse crônico elevaram de forma período-dependente a expressão da proteína GLUT- 4 no tecido adiposo. Adicionalmente, os períodos de RAC combinados ao estresse elevaram a exploração no labirinto de forma período-dependente, efeito antagônico àquele verificado pela RAC fornecida aos animais não estressados. O estresse (crônico e agudo) reduziu a atividade locomotora no labirinto. O estresse agudo reduziu o aporte sanguíneo para algumas vísceras e elevou o nível do hormônio corticosterona. O estresse crônico, por sua vez, reduziu o ganho de peso dos animais. Porém, os parâmetros sanguíneos: insulina, glicose, triacilgliceróis, colesterol total e frações HDL e VLDL+LDL não foram afetados pelos níveis de estresse e nem pelo fornecimento de RAC. A baixa dose de 5 ppm de RAC via oral, apesar de suficiente para suínos, provocou efeitos menos pronunciados em ratos, sugerindo uma metabolização de primeira passagem no fígado dessa espécie. Mesmo nessa dosagem, a RAC potencializou os efeitos do estresse em ratos. Assim, ao extrapolar tais achados os para animais de produção, sugere-se que o estresse pode influenciar negativamente os possíveis efeitos benéficos da RAC.

Palavras-chave: Agonista β -adrenérgico. Desempenho. Metabolismo. Teste do Labirinto em cruz elevado.

ABSTRACT

Ractopamine (RAC) is a β -adrenergic agonist used in animal diet as a nutrient repartitioning agent. However, few studies have detailed the biochemical profile involved in the activation of β -adrenergic receptors and their relationship to stress and animal behavior. Thus, this study aimed at evaluating the effect of RAC on metabolism, performance, body composition and behavior using an experimental model in Wistar rats treated with RAC and submitted to stress. The rats were divided into 15 experimental groups with five replicates. The oral dose of 5 ppm of RAC was provided in periods of 07, 14, 21 and 28 days. Protocols for acute (1 hour in a single day) and chronic (one hour per day / 5 times a week / 40 days) restrain stress were performed. The animals were tested on the elevated plus-maze test (EPMT) for behavioral assessment. Insulin and corticosterone levels were determined by ELISA. Total and fraction cholesterol, triglycerides and glucose levels and characteristics of carcass and viscera were evaluated. The determination of insulin dependent glucose transporters (GLUT4) were analyzed by Western Blot epididymal adipocytes. A completely randomized design (CRD) in a factorial 3x5 was employed. The data were submitted to ANOVA and, when necessary, the comparison of means was made by SNK and Regression models. The analysis of the behavior-related variables was done using the Generalized Linear Deviance Model. RAC periods associated with the chronic stress increased, in a time-dependent manner, the protein expression GLUT-4 in adipose tissue. Additionally, periods of stress combined with RAC increased exploration in the maze in a time-dependent manner. An opposite effect was found when RAC was provided to non-stressed animals. Chronic and acute stress reduced locomotive activity in the maze. Acute stress reduced blood supply to certain organs and raised the level of corticosterone. The chronic stress, in turn, reduced weight gain of the animals. However, blood parameters: insulin, glucose, triglycerides, total cholesterol and HDL and VLDL + LDL levels were not affected by stress or by supply of RAC. The low oral dose of 5 ppm of RAC, although sufficient for swine, caused less pronounced effects in rats, suggesting first pass metabolism in the liver of this specie. Even at this dosage, the RAC potentiated the effects of stress in rats. Thus, in extrapolating these findings to animal production, it is suggested that stress may act as a detrimental factor against the possible benefits offered by RAC.

Keywords: β -adrenergic agonist. Performance. Metabolism. Elevated Plus-Maze Tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ação de agonistas β -adrenérgicos (Ligante). Formação do complexo agonista receptor e ativação da proteína G.....	21
Figura 2	Estrutura da Ractopamina. Asteriscos mostrando a presença dos carbonos quirais	27
Figura 3	Distribuição dos animais nos grupos experimentais	35
Figura 4	Modelo de Estresse por imobilização em ratos	38
Figura 5	Labirinto em cruz elevado.....	40
Figura 6	Fluxograma dos tratamentos (Adição de Ractopamina na dieta) e grupos experimentais de acordo com os modelos de estresse agudo e crônico	41
Figura 7	Autorradiograma representativo de <i>western blotting</i> para a proteína GLUT-4 e α -tubulina no tecido adiposo epididimário de ratos recebendo 5 ppm de Ractopamina (RAC)	52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Variações da quantidade de GLUT-4 no tecido adiposo epididimário conforme os diferentes períodos de tratamento com ractopamina (RAC), para animais submetidos a estresse crônico.....51
- Gráfico 2 Variações dos números de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado conforme os diferentes períodos de tratamento com ractopamina (RAC), para animais do grupo sem e com estresse (agudo e crônico). Grupos Estresse Agudo e Crônico ajustados para uma única equação pela Análise de *Deviance*.....54
- Gráfico 3 Variações de tempo de permanência nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado conforme os diferentes períodos de tratamento com ractopamina (RAC), para animais do grupo sem estresse, estresse agudo e estresse crônico.54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da ração utilizada durante o período experimental...37
Tabela 2	Desempenho e características de carcaça de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.48
Tabela 3	Peso relativo visceral (%) de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.49
Tabela 4	Parâmetros sanguíneos de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.50
Tabela 5	Quantificação da proteína GLUT-4 no tecido adiposo de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a estresse crônico.51
Tabela 6	Parâmetros comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado pelos ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse `53
Tabela 7	Parâmetros comportamentais de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse, no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Mecanismo de Ativação dos Receptores β-Adrenérgicos	19
3.2	Subtipos dos Receptores β-Adrenérgicos	23
3.3	Efeitos farmacológicos da Ractopamina	26
3.4	Efeitos comportamentais da Ractopamina	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Animais e procedimentos experimentais	34
4.2	Rações e Manejo Alimentar	35
4.3	Exposição ao estresse	37
4.4	Avaliação do Desempenho	38
4.5	Teste do labirinto em cruz elevado (TLCE)	39
4.6	Eutanásia dos Animais	42
4.7	Avaliação sanguínea	42
4.8	Avaliação das carcaças, vísceras e músculos	42
4.9	Western Blot para GLUT – 4	43
4.10	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	56
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
8	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICES	84

1 INTRODUÇÃO

Os agonistas β -adrenérgicos (ABAs) têm sido empregados usualmente em terapêutica humana e veterinária como broncodilatadores ou como tocolíticos. Entretanto, mais recentemente, eles têm sido empregados como potentes agentes de incremento de massa protéica (incremento de massa magra) e redutores do tecido adiposo corporal.

A utilização de ABAs na produção animal é de interesse para produtores e consumidores de carne. Especialmente na produção de carne suína (onde esta prática é extensamente difundida), a geração de protocolos seguros no emprego de agentes de partição confere efeitos ambientais benéficos (SUTTON et al., 2001), diminuindo a quantidade de animais abatidos e conseqüentemente a poluição gerada por eles. Entre os ABAs, destacam-se o clenbuterol, salbutamol e, em especial, a ractopamina (RAC). Devido à sua menor toxicidade, baixa fixação às proteínas plasmáticas e facilidade de biotransformação, esta substância desponta de forma factível para uso como modificador de carcaça pelo efeito repartidor de nutrientes (SMITH, 1998).

Nas últimas décadas houve um grande avanço de pesquisas na área e uma rápida expansão da RAC no mercado. No entanto, observam-se divergências entre os países quanto a legislação relacionada a sua utilização. Países pertencentes à União Européia não permitem a utilização de substâncias como promotores de crescimento (Directiva 96/22/CE) (SERRATOSA et al., 2006), porém outros, como Estados Unidos e Brasil, aprovam seu uso para finalidades zootécnicas em suínos (BRASIL, 2008; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2012).

Agentes como a RAC realizam seus efeitos por meio da ligação em receptores β -adrenérgicos e conseqüente ativação de adenilatociclase e proteinaquinase A. Este mecanismo é idêntico ao incitado pelos agonistas

endógenos; adrenalina e noradrenalina. Porém, a exposição prolongada das células a esses agonistas sintéticos pode gerar *down-regulation* desses receptores (LIU et al., 1994), mecanismo pelo qual a intensidade da resposta mediada se reduz. Desta forma, situações de estresse podem interferir na farmacodinâmica da RAC. Adicionalmente, animais de abate estão constantemente submetidos a estresse de confinamento, manejo e transporte (MARCHANT-FORDE et al., 2003) o que torna os resultados do presente estudo importantes do ponto de vista da produção animal moderna.

Os efeitos da RAC no metabolismo lipídico e especialmente seus mecanismos de ação ainda são controversos na literatura. A redução da deposição de tecido adiposo na carcaça de suínos alimentados com dietas contendo RAC já foi relatada (MIMBS et al., 2005; SEE; ARMSTRONG; WELDON, 2004; UTTARO et al., 1993), sugerindo a ativação de duas prováveis vias metabólicas: redução da lipogênese e/ou o aumento da lipólise. Não existe atualmente um consenso a respeito destes mecanismos, de modo que alguns trabalhos *in vitro* mostram que a diminuição do tecido adiposo na carcaça dos animais ocorre por aumento da lipólise (LIU; BOYER; MILLS, 1989), enquanto outros sugerem ser a diminuição da lipogênese (MILLS et al., 1990). Adicionalmente, foi demonstrado que adipócitos isolados de ratos *Sprague-Dawley* estimulados pela RAC apresentaram tanto aumento da lipólise quanto inibição da lipogênese, processos estes que ocorreram de forma eficiente e com potências equivalentes (HAUSMANN et al., 1989).

As informações a respeito do potencial do uso da RAC sobre os parâmetros metabólicos são ressaltados na maioria dos experimentos, sendo ainda escassas na literatura as informações sobre o comportamento. Um estudo em suínos demonstrou que animais tratados com RAC permaneceram mais ativos, ficaram menos tempo deitados, frequentaram por maior período os alimentadores e apresentaram maior dificuldade de manejo (MARCHANT-

FORDE et al., 2003). Desta forma, modelos experimentais podem contribuir na avaliação fisiológica, molecular e comportamental em animais de laboratório, produzindo conhecimentos que poderão futuramente ser extrapolados na produção animal para comerciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal da autora com esse trabalho foi verificar o efeito da RAC sobre o metabolismo, desempenho, composição corporal e comportamento de ratos submetidos a diferentes tipos de estresse por imobilização aguda e crônica. Assim, pretendeu-se aprimorar o período de adição de RAC na ração para obtenção de um melhor efeito dose-resposta nos animais sujeitos a estresse. A hipótese levantada foi a de que o estresse interfere diretamente na farmacodinâmica da RAC, uma vez que níveis aumentados de catecolaminas endógenas – adrenalina e noradrenalina – podem interferir na regulação de receptores β disponíveis. Baseados nestes pressupostos, períodos crescentes de administração de RAC foram testados de forma a se avaliar parâmetros metabólicos e comportamentais.

2.2 Objetivos específicos

Verificar se o estresse (agudo ou crônico) afeta o desempenho (consumo e ganho de peso), as características de carcaça (peso, proteína bruta e extrato etéreo e pesos de algumas frações musculares), os pesos de vísceras, os parâmetros sanguíneos bioquímicos (glicose, triacilglicerol, colesterol total e frações *High Density Lipoprotein* – HDL, *Low Density Lipoprotein* e *Very Low Density Lipoprotein* - LDL + VLDL), parâmetros sanguíneos hormonais (insulina e corticosterona) e o comportamento (Teste do Labirinto em Cruz Elevado) de animais tratados com RAC. Desta forma, por meio de todos os

parâmetros analisados, pretendeu-se verificar a influência do estresse na resposta metabólica de ratos tratados com RAC.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As exigências do mercado consumidor quanto à qualidade dos alimentos vêm crescendo a cada ano. A preocupação com a saúde e a busca por alimentos com melhores aspectos sensoriais incentivam não só o melhoramento genético dos produtos, mas também, os recursos tecnológicos neles utilizados. Nesse cenário, a RAC representa um recurso nutricional de grande importância, objetivando a otimização da produção de carne, principalmente suína (BRIDI et al., 2006).

Esse agonista tem ações sobre o metabolismo animal, sendo capaz de melhorar índices de desempenho e características da carcaça. As alterações zootécnicas observadas são realizadas por meio de um redirecionamento de nutrientes para algumas determinadas características. Dessa forma, observa-se um aumento de ganho de peso e retenção de proteína na carcaça, sem, no entanto, alterações no consumo alimentar de suínos que receberam a RAC na dieta (ARMSTRONG et al., 2005; DUNSHEA et al., 1993). Adicionalmente, esses animais podem apresentar reduções no tecido adiposo e acréscimos principalmente relacionados à musculatura de áreas nobres (ADEOLA et al., 1990; GU et al., 1991; HALSEY et al., 2011). Com relação a outras espécies, principalmente bovinos, existem algumas limitações no uso desse agonista. As diferenças de maciez entre as áreas musculares mais e menos nobres nessa espécie podem ser influenciadas por meio das ações da RAC na carcaça, aumentando, por exemplo, a força de cisalhamento de algumas porções musculares (BOLER et al., 2012).

Apesar da ampla utilização da RAC em animais de produção, estudos com promotores de crescimento em modelos experimentais têm contribuído para a determinação de protocolos farmacológicos mais precisos e adequados, levando em consideração sua farmacocinética e farmacodinâmica (SMITH;

PAULSON, 1994). Tais modelos, como os de ratos, podem simular mecanismos fisiológicos e patológicos, sendo seus resultados extrapolados para outras espécies. As vantagens de se utilizar os chamados modelos experimentais são diversas, principalmente com relação às questões econômicas, temporais, físicas ou mesmo éticas. Quando comparados a outras espécies, ratos possuem menor custo para sua aquisição e manutenção, menor período de vida médio, alta taxa reprodutiva, ciclos estrais e gestacionais reduzidos e menor demanda de espaço físico para seus alojamentos e instalações. Além disso, algumas questões éticas muitas vezes impedem ou dificultam as pesquisas em outras espécies animais. Assim, em muitas situações, os ratos podem ser modelos de eleição para vários ensaios tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária (DAMATTA, 2010; FAGUNDES; TAHA, 2004).

3.1 Mecanismo de Ativação dos Receptores β -Adrenérgicos

Um grande avanço já foi alcançado no entendimento dos mecanismos de ação dos repartidores de nutrientes. Tais compostos são capazes de interferir no metabolismo animal a partir de uma resposta fisiológica que é produzida quando um agonista β -adrenérgico (ABA) se liga a um receptor β -adrenérgico (RBA). Existe um consenso do mecanismo básico de funcionamento dos RBAs na presença de um agonista. Os ABAs são moléculas orgânicas que se ligam aos receptores, mudando sua conformação e formando um complexo agonista-receptor capaz de ativar a proteína Gs (proteína G estimulatória) (RAPIEJKO et al., 1986) (Figura 1). A subunidade α da proteína Gs por sua vez ativa a Adenilato Ciclase, enzima que produz a Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPC), uma das principais moléculas sinalizadoras no meio intracelular. O AMPC, então, se liga à subunidade regulatória da Proteína Quinase A (PKA), liberando sua subunidade catalítica, e esta é capaz de fosforilar um grande número de proteínas intracelulares. Algumas destas proteínas são enzimas que

são ativadas quando fosforiladas (por exemplo: lipase hormônio sensível, enzima limitante da degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo). A proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) é fosforilada pela PKA. Após a fosforilação, a CREB se liga ao elemento de resposta do AMPc na porção regulatória de um gene e estimula sua transcrição. Dessa forma, uma série de genes pode ser transcrita nas células dos mamíferos quando esta for mediada pelos ABAs. Por outro lado, algumas enzimas podem ser inativadas quando fosforiladas (por exemplo: a acetil-CoA carboxilase, enzima reguladora da síntese de ácidos graxos de cadeia longa), podendo causar efeitos adicionais por esses agonistas (LIGGETT; RAYMOND, 1993; MERSMANN, 1989a; STROSBURG, 1992).

Em quase todos os tipos celulares dos mamíferos existem RBAs, os quais se encontram associados à membrana plasmática. Estes receptores possuem mais de 400 aminoácidos na estrutura primária. Modelos propostos para a estrutura dos receptores indicam a presença de sete domínios transmembrana de natureza hidrofóbica, os quais são responsáveis por ancorar os receptores na estrutura das membranas. Existem quatro segmentos do lado extracelular (três alças conectam estas porções aos domínios transmembrana) e quatro segmentos do lado intracelular (também conectados por três alças aos domínios transmembrana) (Figura 1).

O local de ligação do agonista é no centro das sete alças transmembrana e envolve os aminoácidos dos diversos outros domínios (OSTROWSKI et al., 1992). O local de ligação à proteína Gs está localizado nas alças dois, três e quatro da porção intracelular. Para evitar a ativação permanente do RBA, o agonista pode ser removido por recaptação e metabolizado ou o receptor pode ser inativado por diversos mecanismos, como fosforilação e dessensibilização. Depois da ligação com o agonista esse receptor pode ser fosforilado por uma enzima quinase específica, que se localiza na alça quatro intracelular. A PKA

também pode fosforilar o receptor, inativando-o. Durante as condições de estimulação crônica desse receptor, a resposta pode ser reduzida por uma diminuição na sua disponibilidade devido à remoção da membrana (HEIN; KOBILKA, 1995; STROSBURG, 1993).

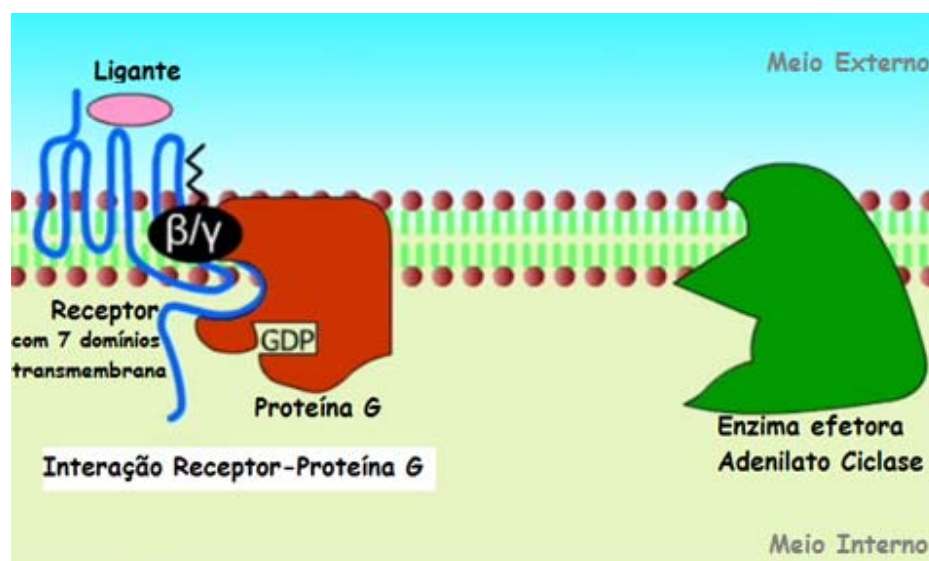


Figura 1 Mecanismo de ação de agonistas β -adrenérgicos (Ligante). Formação do complexo agonista receptor e ativação da proteína G
 Fonte: Universidade Federal de Lavras - UFLA (2011)

Alguns mecanismos menos diretos também podem contribuir para os efeitos dos agonistas administrados aos animais. Por exemplo, um possível aumento no fluxo sanguíneo ou no débito cardíaco. Um aumento desse fluxo para determinadas regiões, como a muscular, poderia resultar em um maior afluxo de nutrientes melhorando as condições para a hipertrofia muscular (síntese proteica). Adicionalmente, um maior fluxo sanguíneo para o tecido adiposo poderia resultar em maior remoção dos ácidos graxos livres e com isso estimular a lipólise. Uma possível explicação para esse aumento no fluxo sanguíneo é a elevação na frequência cardíaca (MERSMANN, 1989a).

Entretanto, no estudo de Catalano et al. (2012) a RAC não foi capaz de alterar a frequência cardíaca, os parâmetros cardiográficos ou a contagem de células sanguíneas, aumentando apenas as dimensões ventriculares do coração na espécie suína.

Outros efeitos dos ABAs ainda podem ser verificados por meio da modulação da liberação de certas substâncias endócrinas. Em suínos, observou-se um aumento nos níveis plasmáticos de ácidos graxos não esterificados (AGNE), glicerol e lactato (MERSMANN, 1989b). Em ovinos, após duas horas de ingestão do agonista, foram verificados maiores concentrações de insulina, glicose, e também de AGNE e glicerol (O'CONNOR et al., 1991). Estas respostas agudas sugerem que há uma estimulação direta da glicogenólise e lipólise, sendo esta, uma alteração característica dos ABAs no metabolismo de carboidratos e lipídios. Ainda, segundo Mersmann (1989b), os efeitos agudos causados por ABAs no tecido adiposo podem ser por resposta direta devido à ligação do agonista no receptor, combinada aos efeitos indiretos, como o aumento do fluxo sanguíneo nesse tecido. Segundo o autor, a administração aguda de agonistas sintéticos em suínos estimula a liberação de catecolaminas endógenas, as quais poderiam mediar uma série de efeitos em vários órgãos. Além das respostas agudas, efeitos crônicos também foram verificados na utilização de ABA. Dessa forma, a administração crônica de cimaterol, reduziu as concentrações de insulina e de tetraiodotironina (T4), sem maiores alterações nas concentrações de glicose e no Fator de Crescimento semelhante a insulina Tipo 1 (IGF-I) na espécie ovina (O'CONNOR et al., 1991). Em suínos, a RAC alterou os padrões da glândula tireoide, promovendo uma redução do seu peso e também dos níveis de triiodotironina (T3) circulantes (CATALANO et al., 2012).

Os ABAs podem influenciar as taxas metabólicas em vários tecidos, podendo alterar as concentrações de uma série de nutrientes no sangue. Tal fato

sugere que os agonistas poderiam modificar o metabolismo basal e ainda que esses mecanismos ocorram de forma integrada. Dessa maneira, as características farmacocinéticas (absorção, distribuição e eliminação) e farmacodinâmicas (interação com os receptores e mecanismo de ação) são de grande importância para a eficiência dos ABAs. Na eleição desses fármacos, portanto, devem ser considerados vários fatores como: dose, formulação, via de administração, estabilidade na presença de certos alimentos, espécie do animal, idade, sexo, dentre outros (MERSMANN, 1998).

3.2 Subtipos dos Receptores β -Adrenérgicos

Os efeitos dos Agonistas β -Adrenérgicos (ABAs) podem ser mais pronunciados em algumas espécies do que em outras. Tais diferenças podem estar relacionadas à capacidade do β -agonista em estimular os receptores nos tecidos alvo de formas diferentes entre as espécies. Existem três subtipos de Receptores β -Adrenérgicos (RBAs): o β_1 , o β_2 e o β_3 , além dos receptores α (EMORINE et al., 1989; KIM et al., 1991); e estes estão presentes em praticamente todas as células dos mamíferos. Porém, para uma dada espécie, pode haver variações na distribuição e na proporção dos subtipos entre os diversos tecidos. Além disso, entre as diferentes espécies, os subtipos variam quanto sua distribuição nos tecidos e sua sequência de aminoácidos. Dessa forma, a multiplicidade de efeitos fisiológicos controlados por esses receptores tornam os mecanismos dos diferentes ABAs, bastante complexos e difíceis de serem compreendidos (MERSMANN, 1998).

A existência de diferentes tipos de β -receptores e a grande diversidade quanto a sua distribuição trouxeram uma visão prototípica com relação aos tecidos, ou seja, os tecidos que apresentam predominância de certo subtipo vai apresentar as funções fisiológicas que decorrem da estimulação deste tipo de

receptor. Exemplos de tecidos chamados prototípicos são: o coração de ratos e a musculatura lisa traqueo-brônquica de cobaias. Estes apresentam respostas típicas de β_1 e β_2 , respectivamente (MERSMANN, 1998). A maioria dos tecidos apresenta mais de um subtipo e a proporção entre eles depende do tecido e da espécie. O sequenciamento de RBAs em algumas espécies indicou que os três subtipos de receptores têm aproximadamente 50% de homologia na sequência de aminoácidos dentro de uma única espécie, enquanto que os subtipos individuais têm 75% ou mais de homologia entre as espécies (HALL et al., 1993; PIETRI-ROUXEL; STROSBURG, 1995).

O conhecimento do subtipo de receptor presente em um dado tipo celular pode trazer informações sobre o tipo e intensidade das respostas por um determinado tecido e/ou espécie. Há um conhecimento limitado sobre os subtipos presentes no tecido adiposo e no músculo esquelético os quais são capazes de responder aos agonistas. Em bovinos, é possível identificar a presença dos três subtipos de β -receptores, havendo uma predominância de β_2 no músculo esquelético e no tecido adiposo (PIETRI-ROUXEL et al., 1995). Em ovinos, estudos indicam a predominância de β_2 nos adipócitos. Casteilla et al. (1994) constataram que os três subtipos de β -receptores são transcritos no tecido adiposo de bovinos e atribuiu a presença dos β_3 à adipócitos do tecido adiposo marrom. Alguns estudos identificaram as sub-populações presentes no tecido adiposo e no músculo esquelético de suínos, verificando a presença principalmente de β_1 e β_2 nesses tecidos, no entanto, as proporções para cada tipo ainda não foram muito bem esclarecidas. O receptor β_1 parece ser o subtipo predominante em adipócitos de suínos, podendo mediar a maior parte da resposta lipolítica. Segundo Mills, Spurlock e Smith (2003), ambos os receptores β_1 e β_2 contribuíram para a lipólise, sendo que 50 a 60% da resposta foi proveniente de β_1 . Mcneel e Mersmann (1999) confirmam a maior representatividade desse subtipo na lipólise, mas observaram uma prevalência de

73% com relação aos demais receptores. Os autores ainda verificaram diferenças na ocorrência dos subtipos para alguns tecidos de suínos, e as proporções encontradas para $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ foram respectivamente: ventrículo esquerdo do coração = 72: 28: 25; pulmão = 67: 33: 0,2; fígado = 45: 55: 0; músculo esquelético = 60: 39: 0,7; e adiposo subcutâneo = 73: 20: 7. Sendo que, a concentração de RNAm para $\beta 3$ no tecido adiposo subcutâneo dessa espécie foi dez vezes menor que no tecido adiposo perigonadal de ratos (MERSMANN, 1996).

Para os roedores, observou-se o $\beta 3$ como subtipo predominante e o responsável por mediar a maior parte da resposta lipolítica (HOLLENGA; ZAAGSMA, 1989). No músculo esquelético, o subtipo $\beta 2$ mostrou ser predominante nos ratos, no entanto, o subtipo $\beta 3$ também foi identificado nesse tecido (KIM et al., 2010). Nos músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio, principalmente nas áreas de fibras musculares oxidativas ele foi encontrado (EMORINE et al., 1989). Os subtipos também foram encontrados em outros tecidos corporais dos ratos. No íleo, por exemplo, foi detectada a expressão dos receptores $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. A comparação de tecidos apresentou a seguinte ordem decrescente de expressão de $\beta 3$: tecido adiposo branco, cólon = íleo, córtex cerebral, músculo sóleo; $\beta 1$: córtex cerebral, tecido adiposo branco, íleo = cólon, sóleo; e subtipo $\beta 2$: músculo sóleo, tecido adiposo branco, íleo = cólon, córtex cerebral (ROBERTS et al., 1999).

Esses receptores desempenham um papel significativo na regulação da função celular e existem importantes diferenças espécies-específicas ao nível de expressão de vários subtipos dos RBAs. Por exemplo, algumas informações sobre o fenômeno de *down-regulation*, descritas principalmente em suínos, podem contribuir para maiores esclarecimentos relacionados a esses receptores. A exposição prolongada das células adiposas aos agonistas pode promover dessensibilização dos RBAs (LIU et al., 1994). Tal evento parece ocorrer

preferencialmente com β_2 se comparado ao subtipo β_1 , sendo o subtipo β_3 ainda menos sensível (LAFONTAN, 1994; MARULLO et al., 1995). Em suínos, foi visto que o isômero RR da RAC, sendo esta uma mistura de quatro estereoisômeros RR, RS, SR, SS, exibe ativação seletiva pelo receptor β_2 , podendo limitar a resposta lipolítica desse agonista. Contudo, foi sugerido que há um agonismo parcial da RAC no subtipo β_1 , e que ambos os subtipos nos adipócitos foram suficientes para ativar a lipólise (MILLS; SPURLOCK; SMITH, 2003). Spurlock et al. (1994) não encontraram o efeito de dessensibilização no músculo de suínos, como visto no tecido adiposo e sugeriu ainda que os efeitos positivos encontrados no tecido muscular talvez não fossem mediados pelos RBAs. Portanto, a compreensão da heterogeneidade dos receptores e da interação receptor-efetor é essencial para melhores abordagens farmacológicas e também terapêuticas, sempre levando em consideração a espécie alvo (LAFONTAN; BERLAN, 1993).

3.3 Efeitos farmacológicos da Ractopamina

Vários trabalhos realizados em suínos e ratos buscam desvendar os efeitos da Ractopamina (RAC) sobre os tecidos muscular e adiposo. Em estudo realizado por Ricke et al. (1999), foi preparada uma solução com a RAC coletando seus estereoisômeros por meio de filtração. Isto foi possível porque a estrutura química da RAC apresenta dois carbonos quirais, que são aqueles que possuem quatro ligantes diferentes (Figura 2). Dessa forma cada carbono quiral pode existir em duas conformações diferentes, R e S, sendo então a RAC uma mistura de quatro estereoisômeros. Os efeitos destes estereoisômeros (RR, RS, SR, SS) foram comparados aos efeitos da RAC em ratas. Os animais receberam 320 $\mu\text{g}/\text{d}$ de RAC ou 80 $\mu\text{g}/\text{d}$ de cada um dos estereoisômeros. Os agonistas β -adrenérgicos (ABAs) foram administrados via intraperitoneal por 14 dias por

meio de bombas osmóticas. A RAC e seu isômero RR aumentaram significativamente o consumo alimentar, o peso corporal e a absorção e retenção de proteína bruta na carcaça. Adicionalmente, houve diminuição do tecido adiposo das vísceras e da carcaça. Este estudo demonstrou que o isômero RR é o maior responsável pelos efeitos de crescimento de massa magra da RAC em ratos.

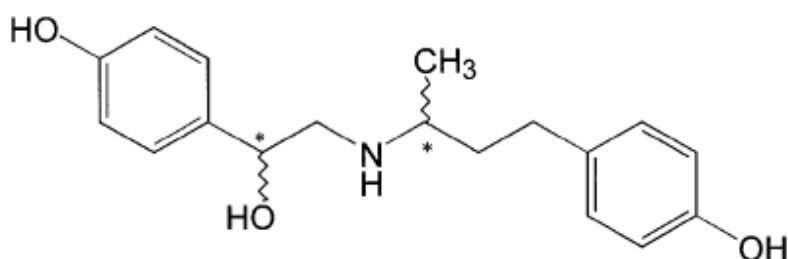


Figura 2 Estrutura da Ractopamina. Asteriscos mostrando a presença dos carbonos quirais
Fonte Ricke et al. (1999)

Os ABAs são capazes de reduzir a massa de tecido adiposo. Esses agonistas estimulam a degradação e inibem a biossíntese de triacilgliceróis, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em diversas espécies (DUBROVIN; LIU; MILLS, 1990; HAUSMAN et al., 1989; MIMBS et al., 2005). A elevação da quantidade de ácidos graxos livres no plasma após a administração desses agonistas indica uma ativação no sistema lipolítico dos animais (ADEOLA; MCBRIDE; YOUNG, 1992; BEERMANN et al., 1987).

Porém, os efeitos no tecido adiposo podem não ser persistentes como aqueles no tecido muscular. Acredita-se que haja dessensibilização dos receptores após a administração crônica dos ABAs, com maior relevância no tecido adiposo, havendo maior irregularidade da resposta ao nível deste tecido (LIU et al., 1994; SPURLOCK et al., 1994). Estudos dos efeitos moleculares da

RAC foram conduzidos nas últimas décadas. Liu et al. (1994) avaliaram o efeito da administração de RAC (20 mg/Kg) na ração de suínos. A atividade de enzimas lipogênicas e sua expressão gênica foram avaliadas após administração por 1, 8 ou 24 dias. A RAC não causou efeitos na atividade da acetil-coenzima A carboxilase ou enzima malica no tecido adiposo subcutâneo. A expressão de RNAm para acetil-coenzima A carboxilase e para transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-4) também não foi afetada pela administração de RAC. Entretanto, a RAC aumentou a retenção de nitrogênio, a área do músculo longíssimo e a expressão gênica de α -actina no músculo esquelético. Os autores sugeriram que os efeitos da RAC no tecido adiposo podem ser mascarados por uma combinação de fatores incluindo falta de sensibilidade tecidual, limitação da dosagem de RAC e *down-regulation* de receptores β -adrenérgicos.

O estudo de Halsey et al. (2011), apesar de citar o evento de *down-regulation* como possível para tal tecido, descreve a ocorrência de reduções na expressão de genes lipogênicos: Proteína-1 Ligadora do Elemento Regulado por Esteróis (SREBP-1), PPAR γ 2, Ácido Graxo Sintetase (FAS) e GLUT-4; mesmo com o fornecimento de RAC após períodos de 42 dias. Adicionalmente, discordando de Liu et al. (1994), a dose de 20 mg/Kg em seu estudo foi capaz de promover as alterações na expressão desses genes. Outro tratamento semelhante, pelo período de 52 dias com esse agonista, também reduziu a expressão de genes relacionados ao anabolismo de lipídios, como o FAS, GLUT-4, SREBP-1, estearoil-CoA dessaturase (SCD) e leptina, e aumentou a expressão daqueles catabólicos como a Carnitina palmitoil-1 (CPT-1) e o acil-CoA desidrogenase (ACDH) (REITER et al., 2007).

Outro ABA, o Clenbuterol melhorou a porcentagem de carne magra, reduziu o tamanho das células adiposas e aumentou a espessura das fibras musculares em suínos. Do total de 3358 genes, os níveis de RNAm de 82 genes foram diferencialmente expressos nas análises de *cDNA Microarrays*. Sendo

que, desses 82 genes, 16 estavam relacionados a genes do metabolismo celular (incluindo cinco relacionados ao metabolismo lipídico, como a apolipoproteína D, apolipoproteína R e estearoil-coA dessaturase). A análise de PCR em tempo real, também identificou diferentes níveis de proteínas para oito genes, entre elas, a apolipoproteína R. Esta molécula apresentou maiores níveis tanto de RNA, quanto de proteína e foi considerado um dos pontos críticos pelos quais o clembuterol reduz o acúmulo de gordura (ZHANG et al., 2007).

Outro efeito evidente da administração de ABAs em animais de produção é o aumento da massa muscular. O aumento da síntese protéica e redução de sua degradação podem ser estimulados, contribuindo para o crescimento da massa muscular (KIM; SAINZ, 1992; MERSMANN, 1995). A degradação de proteínas pode ser medida pela atividade de proteases no músculo do animal. Dessa forma, as ações de ABA podem ser tanto na redução da atividade de proteases quanto no aumento da concentração de certos inibidores destas proteases (SAINZ et al., 1993).

Alguns trabalhos apresentam respostas metabólicas de animais aos ABAs. Em suínos, os níveis plasmáticos de epinefrina foram positivamente correlacionados com a concentração muscular de calpastatina, um inibidor das calpâinas (protease muscular ativada pelo cálcio) (SENSKY et al., 1996). Ainda nessa espécie a RAC aumentou a expressão de genes de α -actina no músculo esquelético (LIU et al., 1994). Em ratos, o clembuterol preveniu a perda de RNAm da α -actina em músculos esqueléticos atrofiados por denervação (BABIJ; BOOTH, 1988). No entanto, é possível observar algumas variações sobre os possíveis efeitos nesses parâmetros, como por exemplo, variações de sensibilidade entre os tipos de fibras musculares e entre os diferentes intervalos de tempo de utilização de ABAs. Já foi observada na literatura uma maior sensibilidade das fibras do tipo II se comparadas àquelas do tipo I, e ainda, uma transição e/ou redução das respostas hipertróficas sob tratamentos prolongados.

Por isso, é importante considerar a natureza temporal de respostas celulares para o tratamento crônico de ABA, bem como os efeitos diferenciais destes compostos sobre o metabolismo de proteínas no músculo esquelético ao investigar os mecanismos de ação destes compostos (KIM; SAINZ, 1992).

Os protocolos para a utilização da RAC são variados na literatura. Cantarelli et al. (2009) avaliaram em suínos o fornecimento de 5 ppm de RAC na ração por 28 dias antes do abate. As características da carcaça em terminação e a viabilidade econômica do uso desse agonista foram analisadas. A adição da RAC aumentou o rendimento da carcaça, a área de olho de lombo, a porcentagem de carne e a relação carne/gordura na carcaça, o índice de bonificação, a receita bruta e a receita líquida da produção e reduziu a espessura de toucinho dos animais. Nessa mesma espécie, Main et al. (2009) avaliaram os efeitos da dose e período de tratamento com RAC sobre o desempenho e composição de carcaça em suínos. As doses administradas foram 0; 5; 7,5 e 10 ppm por 21 ou 28 dias antes do abate. Doses entre 5 e 10 ppm de RAC por período entre 14 a 28 dias resultaram em maior ganho diário de peso, melhor eficiência alimentar e melhor rendimento da carcaça.

Destaca-se que o estudo de diferentes períodos de suplementação é importante, devido à alteração na sensibilidade dos receptores adrenérgicos levando a redução do efeito da RAC. Em suínos, observou-se um aumento linear da resposta de desempenho, até atingir um platô e um posterior decréscimo gradativo (APLLE et al., 2004; DUNSHEA et al., 1993; KELLY; TOKACH; DRITZ, 2003). A definição de protocolos precisos pode culminar com a determinação do menor período de fornecimento necessário para a obtenção dos efeitos desejados e menor custo com o uso de agentes modificadores de carcaça, gerando benefícios diretos ao produtor. Aliado a isso, é essencial o maior esclarecimento acerca dos ABAs, principalmente com relação ao tipo de produção dos animais. Pois, a epinefrina, um agonista fisiológico, tem suas

concentrações aumentadas significativamente durante o estresse (MERSMANN, 1989a), podendo interferir nas respostas dos análogos sintéticos utilizados atualmente, principalmente nos animais sob condições estressantes.

3.4 Efeitos comportamentais da Ractopamina

As informações a respeito do potencial do uso da Ractopamina (RAC) sobre os parâmetros metabólicos são ressaltados na maioria dos experimentos, sendo ainda escassas na literatura as informações sobre o comportamento dos animais de produção sob efeitos dessas substâncias. Porém, tal conhecimento é de extrema relevância do ponto de vista produtivo, ainda mais por se tratar do uso de um agonista β -adrenérgico (ABA), o que motiva a realização de pesquisas nesta área.

Marchant-Forde et al. (2003) avaliaram os efeitos da RAC sobre o comportamento e fisiologia de suínos durante manejo e transporte. Os animais receberam ração contendo 10 ppm de RAC por quatro semanas antes do abate. Durante as duas primeiras semanas, os animais tratados com RAC permaneceram mais ativos, ficaram menos tempo deitados e frequentaram por maior período os alimentadores. Após cada semana da administração de RAC, os animais apresentaram maior dificuldade de manejo, maior frequência cardíaca na presença de pessoas não-familiares e durante transporte. Adicionalmente, os animais tratados apresentaram níveis mais elevados de catecolaminas circulantes que os animais controle. Os resultados demonstraram que a RAC afetou o comportamento e parâmetros fisiológicos como a frequência cardíaca e os níveis de catecolaminas de animais em fase de terminação, dificultando o manejo e potencialmente deixando os animais mais suscetíveis aos efeitos do estresse de manejo e transporte.

Os modelos experimentais têm auxiliado os pesquisadores nas investigações comportamentais, para a compreensão dos mecanismos subjacentes à depressão e ansiedade e para a avaliação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de fármacos (ROCHA et al., 2007). A ansiedade dos animais pode ser avaliada utilizando-se o teste do labirinto em cruz elevado (TLCE). Este teste baseia-se em um conflito entre a curiosidade em explorar ambientes novos e a aversão natural dos roedores a espaços abertos (representados pelos braços abertos do labirinto) (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; PELLOW et al., 1985; ROCHA et al., 2007). Por meio da sensação tátil dada pelas vibrissas, o animal percebe o ambiente ao seu redor. O contato das vibrissas com as paredes verticais faz com que o animal sinta-se mais seguro. Enquanto os braços abertos geram medo e ansiedade. Há preferência dos animais pelos braços fechados (tigmotaxia) (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). A ansiedade é medida pela aversão dos ratos pelos braços abertos do labirinto. Portanto, se um tratamento diminui a preferência do animal pelos braços abertos, é tido como ansiogênico (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; PELLOW et al., 1985).

Os receptores β -adrenérgicos estão envolvidos em respostas relacionadas ao estresse. Gorman e Dunn (1993) estudaram os efeitos do L-propranolol no comportamento de ratos submetidos a estresse por imobilização. O TLCE mostrou que o propranolol administrado previamente preveniu as mudanças comportamentais induzidas pelo estresse. O propranolol também diminuiu os níveis de corticosterona plasmática, que foi medida após o teste do labirinto. Para investigar mais profundamente o papel de β -adrenérgicos no comportamento dos ratos, os efeitos do isoproterenol, um ABA, foram testados pelos autores. O isoproterenol produziu um aumento dose-dependente no comportamento defensivo e o propranolol impediu tais mudanças comportamentais. Tal fato, sugere o envolvimento de β -adrenérgicos em alterações comportamentais relacionados com estresse e ainda que a agonistas β -

adrenérgicos exercem efeitos ansiogênicos. Porém, estudos considerando o comportamento de roedores no labirinto em cruz elevado (LCE) após o tratamento com RAC ainda são desconhecidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os animais do presente estudo foram fornecidos pelo Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras – UFLA. O protocolo utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (NINTEC) da UFLA, de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) sob protocolo 004/2010.

4.1 Animais e procedimentos experimentais

Foram utilizados 75 ratos (*Wistar*) machos com aproximadamente 60 dias de idade e peso de 220-260g. Os animais foram divididos em 15 grupos experimentais de acordo com os tratamentos descritos na Figura 3. Cada grupo foi formado por cinco animais selecionados aleatoriamente. Estes foram mantidos no Biotério, em gaiolas individuais e ambiente semi-controlado com ciclo claro/escuro de 12/12 h, recebendo água à vontade uma ração própria para a faixa etária de forma a atender as suas exigências nutricionais. Todos os procedimentos experimentais foram realizados no período da manhã, entre 8 h e 12 h. Os animais e a ração eram pesados uma vez ao dia, durante todo período experimental.

Grupos experimentais	
Níveis de Estresse	Períodos de Ractopamina (RAC)
Sem Estresse	Sem RAC
	RAC 5 ppm por 07 dias
	RAC 5 ppm por 14 dias
	RAC 5 ppm por 21 dias
	RAC 5 ppm por 28 dias
Estresse agudo (única sessão -1 hora)	Sem RAC
	RAC 5 ppm por 07 dias
	RAC 5 ppm por 14 dias
	RAC 5 ppm por 21 dias
	RAC 5 ppm por 28 dias
Estresse crônico (1 hora podia/5x/semana por 40 dias)	Sem RAC
	RAC 5 ppm por 07 dias
	RAC 5 ppm por 14 dias
	RAC 5 ppm por 21 dias
	RAC 5 ppm por 28 dias

Figura 3 Distribuição dos animais nos grupos experimentais

4.2 Rações e Manejo Alimentar

A alimentação utilizada para o grupo de animais que não recebeu RAC foi realizada por meio de ração comercial de acordo com recomendação para dieta de roedores do *American Institute of Nutrition (AIN-93M)*, estabelecida por Reeves, Nielsen e Fahey Junior (1993) (Tabela 1). Para o grupo de animais que recebeu dieta com RAC, foi oferecida uma ração experimental, de acordo com seu peso metabólico, garantindo assim que estes ingerissem a RAC na dose

correta (5 ppm). A opção por tal dosagem foi uma tentativa de se evitar os efeitos de *down-regulation* induzida por acúmulo de agonistas sobre receptores β -adrenérgicos. A ração experimental também foi de acordo com AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JUNIOR, 1993) e produzida por meio da repeletização da ração comercial, adicionando 5 ppm de RAC e acrescentando 30% de lisina em relação aos animais dos grupos controle (Tabela 1). Essa adição de lisina é recomendada por Mitchell, Solomon e Steele (1991) para que animais tratados com RAC atinjam resultados satisfatórios de desempenho e qualidade de carcaça. Segundo os autores ainda, a suplementação de lisina somente é necessária para os grupos de RAC, pois esse excedente do aminoácido não é aproveitado por animais sem repartidores de nutrientes na dieta, sendo, portanto, eliminado do organismo sem promover efeitos.

Tabela 1 Composição da ração utilizada durante o período experimental

COMPONENTE (g/KG DE RAÇÃO)	RAÇÃO CONTROLE	GRUPOS RAC
Caseína	200	200
Lisina HCl 78%*	0	5
Sacarose	100	100
Amido	549,8	549,8
Óleo de soja	50	50
Celulose	50	50
Mix mineral	35	35
Mix vitamínico	10	10
Colina	2	2
Metionina	3	3
Vitamina E	0,1	0,1
BHT	0,1	0,1
TOTAL	1000	1000
RACTOPAMINA (ppm)	0	5

* Cálculo baseado na suplementação em 30% (MITCHELL; SOLOMON; STEELE, 1991) nos valores recomendados para roedores (13 g/Kg) (REEVES; NIELSEN; FAHEY JUNIOR, 1993).

4.3 Exposição ao estresse

Os animais foram estressados utilizando-se modelos previamente validados. Estes modelos consistiram na imobilização por uma hora/dia, cinco dias por semana, por 40 dias no modelo de estresse crônico (ELY et al., 1997; GAMEIRO et al., 2005) ou por uma única exposição no modelo de estresse agudo, realizado ao final do período experimental, ou seja, no dia da eutanásia

(GAMARO et al., 1998; GAMEIRO et al., 2005). Este modelo de indução de estresse foi baseado em recente revisão que indicou esta modalidade como preferível para estudo de estresse, uma vez que não é doloroso e também não debilita o animal (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009). Os ratos foram imobilizados por meio de seu posicionamento em recipientes plásticos adaptados de acordo com o tamanho/peso do animal por período de uma hora. Os recipientes plásticos apresentaram uma abertura de 1 cm posicionado nas vias aéreas para promover a respiração (figura 4). Um grupo controle foi observado, para comparações entre animais estressados e não estressados. A imobilização foi realizada em ambiente silencioso, sempre no mesmo horário e com luminosidade padronizada, para evitar estresse adicional ou interferências de ciclo circadiano.



Figura 4 Modelo de Estresse por imobilização em ratos

4.4 Avaliação do Desempenho

O ganho de peso médio diário dos animais foi calculado por meio dos registros dos pesos dos animais durante o período experimental. O consumo de ração médio diário foi determinado pela subtração da sobra de ração da quantidade de rações que eram fornecidas.

4.5 Teste do labirinto em cruz elevado (TLCE)

Ao final do período experimental os animais foram mantidos em jejum por 12 horas. Após este período, todos os animais dos grupos submetidos a estresse foram submetidos à última sessão de restrição e logo em seguida levados ao labirinto em cruz elevado. O labirinto (Figura 5) foi construído em madeira, apresentando uma altura de 50 cm, e dois braços abertos e opostos (50x10 cm), cruzados em um ângulo reto por dois braços de mesma dimensão fechados por paredes de 40 cm de altura, mas com a porção superior aberta. Uma borda, com altura de 1 cm, envolveu os braços abertos para evitar a queda dos animais. Esse teste comportamental foi realizado em uma sala iluminada artificialmente e com isolamento térmico e acústico. Cada animal foi submetido somente uma vez a este teste comportamental, sendo colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados e, observado durante cinco minutos (MARCONDES et al., 2001; ROCHA et al., 2007). Seu comportamento foi filmado e posteriormente analisado por três pesquisadores treinados e que não sabiam a que tipo de tratamento o animal foi submetido, sendo, portanto um experimento cego. Foi registrado o tempo de exploração dos braços abertos e fechados e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Uma entrada em cada braço foi considerada quando o animal colocava os quatro membros em um braço aberto ou fechado (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; PELLOW et al., 1985). As filmagens foram analisadas pelos três examinadores separadamente e posteriormente foram calculadas as médias de cada tempo.

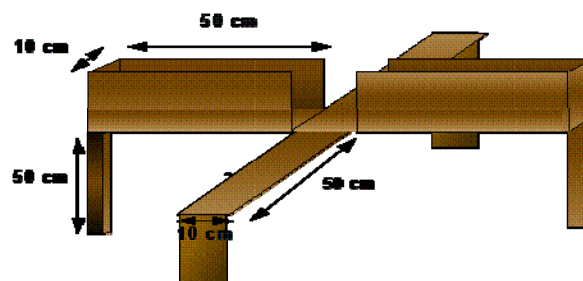


Figura 5 Labirinto em cruz elevado

Fonte: Rocha (2006)

Os resultados foram convertidos posteriormente em: 1) Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (%TBA) ($100 \times \text{tempo (s) nos braços abertos} / \text{tempo total de observação}$); 2) Número de entradas feitas nos braços abertos (EBA); 3) N° de entradas feitas nos braços fechados (EBF). A porcentagem de tempo nos braços abertos é considerada um índice de medo e ansiedade, onde se verifica também a exploração do ambiente. As entradas nos braços abertos estão relacionadas tanto com a atividade locomotora, exploratória, quanto com a ansiedade (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados corresponde a um índice de atividade locomotora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; PELLOW et al., 1985; ROCHA et al., 2007).

Os seguintes parâmetros propostos por Cruz, Frei e Graeff (1994) e Rodgers et al. (1999) também foram avaliados: 1) Número de vezes em que o animal chegou ao final do braço aberto e 2) Avaliação de risco - comportamento de conflito do animal. O número de vezes em que o animal chegou ao final do braço aberto. Este número é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade. A avaliação de risco está diretamente relacionada com o nível de ansiedade e é medido pelo número de vezes que o animal se dirigiu ao centro do labirinto, mas não entrou em outro braço (ROCHA et al., 2007). Todos os períodos experimentais de cada grupo, bem como os períodos de tratamento estão evidenciados no fluxograma a seguir (Figura 6).

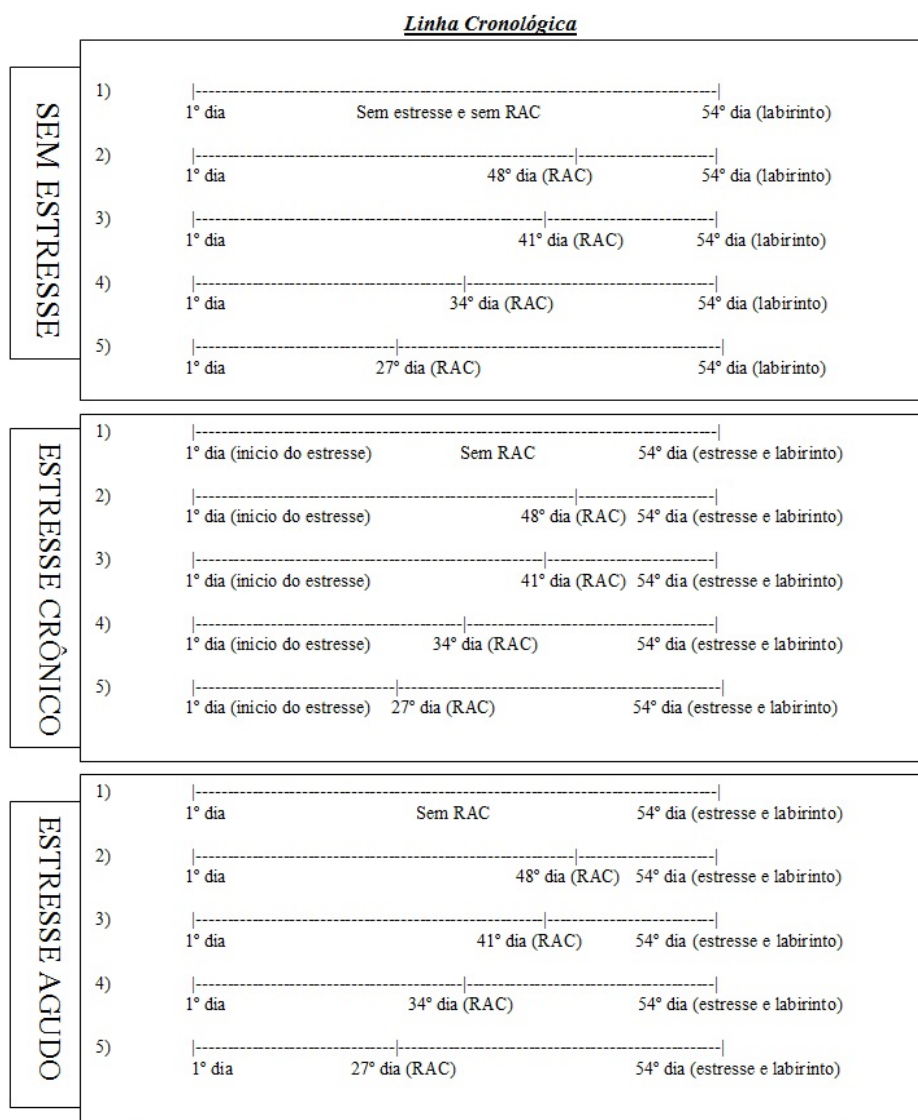


Figura 6 Fluxograma dos tratamentos (Adição de Ractopamina na dieta) e grupos experimentais de acordo com os modelos de estresse agudo e crônico

4.6 Eutanásia dos Animais

Ao final do experimento, após o jejum de 12 horas e o TLCE, os animais foram eutanasiados por decapitação utilizando-se guilhotina apropriada à espécie.

4.7 Avaliação sanguínea

O sangue foi coletado por meio de um tubo de ensaio, imediatamente após a decapitação. Em seguida, foi centrifugado e o soro armazenado à -20 °C, para avaliações dos perfis plasmáticos dos animais. Análises de glicose, triacilglicerol, colesterol total e frações HDL e LDL + VLDL plasmáticos foram quantificados por Kit colorimétrico enzimático (Labtest Diagnóstica SA.).

Níveis de corticosterona e insulina foram determinados pelo Método ELISA, utilizando-se kits comerciais (Arbor Assays e Millipore Corporation para corticosterona e insulina, respectivamente).

4.8 Avaliação das carcaças, vísceras e músculos

Os animais foram dissecados e os pesos das carcaças, de músculos e das vísceras foram avaliados. As vísceras consistiram de trato gastrointestinal, baço coração, rins, fígado e trato reprodutivo. As carcaças consistiram de dorso, ossos, cauda, membros e músculo. Além da carcaça inteira, os pesos dos músculos Gastrocnêmio, Biceps femoral e *Longissimus dorsi* foram obtidos.

Para a análise da composição química das carcaças o conteúdo de nitrogênio foi determinado usando o método *Kjeldahl*, segundo a Association of Official Analytical Chemist - AOAC (1990) e as concentrações de extrato etéreo pela metodologia de Silva e Queiroz (2002).

4.9 Western Blot para GLUT – 4

A quantificação das proteínas GLUT-4 foi realizada pela técnica de *Western Blot*, a partir da extração de proteínas totais do tecido adiposo epididimário dos ratos. A análise foi realizada a partir da coleta de tecido adiposo de animais do grupo controle e do grupo estresse crônico. A opção pela exclusão do grupo estresse agudo nesse teste é justificada pelo curto espaço de tempo entre a única sessão de estresse e a eutanásia, não havendo tempo hábil para promoção de síntese protéica nesse tecido, reduzindo, portanto, a importância de tais resultados. Portanto, as amostras dos grupos testados foram homogeneizadas em tampão comercial de extração suplementado com aprotinina, leupeptina, PMSF e ortovanadato de sódio com protease e inibidor de fosfatase no gelo, seguido de centrifugação a 12000 giros por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e submetido a três ciclos de resfriamento (-80 °C)/aquecimento (37 °C), para completa lise da membrana celular e quantificação da proteína, usando o método de Bradford.

Amostras de 40 µg da proteína total foram adicionadas a um tampão contendo glicerol, SDS e DTT, aquecida e desnaturada a 95 °C por 5 min e carregada em gel de poliacrilamida com SDS. As proteínas foram separadas por eletroforese em um gel de 105 de Tris-HCl poliacrilamida, submetidas a uma voltagem de 100 V por 90 min. Posteriormente, elas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µM (300 mA durante sessenta minutos). As membranas foram bloqueadas com solução salina de Tris-buffer a 5%, caseína e Tween-20 a 0.1%, por uma hora a temperatura ambiente e posteriormente incubada durante a noite a 4 °C, com os anticorpos primários policlonais (*anti-goat*).

Os anticorpos primários (*anti-goat*) e secundários (rabbit *anti-goat IgG*) foram retirados via utilização de um tampão (2-mercaptoetanol 100mM , SDS

2%, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7) por quinze minutos a temperatura ambiente, seguido de um banho de 10 min de dH₂O (2x) e, finalmente, uma lavagem por 10 min em Tris salino, contendo Tween-20 a 0,1%. As membranas foram então incubadas com anticorpos contra uma proteína *housekeeping* (α -tubulina), utilizada como controle positivo. As bandas presentes na membrana foram transferidas para uma película radiográfica utilizando um sistema quimioluminescente. As imagens digitalizadas por filmes radiografados foram obtidas em um sistema de documentação e posteriormente realizou-se a análise de densidade das bandas utilizando software específico (MALFITANO et al., 2010).

4.10 Análise estatística

Um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x5 (três níveis de estresse – sem estresse, estresse agudo e crônico e cinco períodos de tratamento com RAC – 0, 7, 14, 21 e 28 dias) foi utilizado, totalizando 15 tratamentos com cinco repetições. A parcela experimental foi representada por um animal.

Os dados foram submetidos à análise de variância após o teste de normalidade (*Shapiro Wilk*). Quando não atingida à normalidade, a opção de transformação raiz quadrada foi utilizada. Para as seguintes análises utilizou-se transformação: rendimento de carcaça, músculos gastrocnêmio e *Longissimus dorsi*, triacilglicerol, fração VLDL+LDL, insulina e corticosterona. A Análise de Variância foi realizada, e quando significativa ao Teste F, a comparação de médias foi conduzida pelos Testes SNK para níveis de estresse e Regressão para períodos de RAC. Para a maioria das variáveis a análise foi realizada por meio do pacote estatístico *Statistical Analysis System*, do Statistical Analysis System

Institute - SAS Institute (1996), exceto para aquelas relacionadas ao comportamento.

Para as variáveis relacionadas ao comportamento, não foi possível atingir a normalidade. Por se tratar de contagens ou proporções optou-se pela metodologia de Modelo Linear Generalizado. Inicialmente foram realizadas Análises de *Deviance* para verificar a significância dos efeitos principais, estresse e dias de RAC, bem como da interação entre eles. Para os casos de interação significativa, como o fator dias é quantitativo, optou-se por comparar diferentes modelos de regressão que representem o desdobramento dessa interação. Para os dados de contagem, número de entradas no braço aberto, número de entradas no braço fechado, número de vezes que o animal foi até o final do braço aberto e número de vezes que o animal permaneceu no centro, foi utilizada a função logarítmica como função de ligação, ou seja, $\eta = \ln(\mu)$. Assim, o modelo ajustado foi: $\ln(\mu_{ij}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$, em que, μ_{ij} = número médio de vezes que os animais executaram determinada ação, recebendo o estresse i , nos períodos de RAC j . Com $i = 1, 2, 3$ e $j = 1, 2, 3, 4, 5$, μ é uma constante inerente a cada observação, α_i é o efeito i -ésimo nível do estresse, β_j é o efeito j -ésimo nível do fator dias de RAC e $\alpha\beta_{ij}$ é a interação entre os fatores estresse e dias de RAC. Para os dados de proporção de tempo que os animais permaneceram no braço aberto foi utilizada a *logit* como função de ligação, ou seja, $\eta = \ln(\pi / (1 - \pi))$. O modelo ajustado foi semelhante àquele ajustado para os dados de contagem. No entanto, ao invés de considerar $\eta = \ln(\mu_{ij})$, foi considerado $\eta = \ln[p_{ij} / (1 - p_{ij})]$.

Para as variáveis cuja interação entre os fatores estresse e dias de RAC foi significativa, optou-se por identificar o modelo de regressão mais adequado para descrever o efeito dos períodos de RAC para cada estresse. O modelo que apresentou melhor ajuste para as variáveis foi o modelo com intercepto comum: $\ln(\mu_{ij}) = a + b_j x$, onde x = períodos de RAC (0 a 28 dias). Adicionalmente, para

a variável número de entradas nos braços abertos, verificou-se que as retas referentes aos estresses agudo e crônico foram muito semelhantes e por uma nova Análise de *Deviance* constatou-se que estas poderiam ser representadas por uma única equação ajustada. Assim, tem-se uma reta para os tratamentos com estresse e outra sem estresse. Todas as análises relacionadas ao comportamento foram realizadas por meio da Linguagem de programação R 2.12.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

5 RESULTADOS

Não houve interação entre os períodos de tratamento com RAC e os diferentes níveis de estresse em relação ao desempenho, às características de carcaça, aos pesos relativos viscerais e aos parâmetros sanguíneos. Além disso, a adição de RAC na dieta dos animais não influenciou as variáveis citadas ($p>0,05$) (Tabelas 2, 3, 4).

O estresse crônico provocou um menor ganho de peso nos animais, quando comparados aqueles que não sofreram estresse ou aqueles que sofreram estresse agudo ($p<0,05$) (tabela 2).

Tabela 2 Desempenho e características de carcaça de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

Parâmetros	Períodos com Ractopamina (dias) ¹					Níveis de Estresse			CV%
	0	7	14	21	28	SE	EA	EC	
- Desempenho (g/dia) -									
Consumo	18,52	18,03	17,92	18,22	17,80	18,13	18,53	17,63	8,03
GP	1,55	1,35	1,21	1,36	1,27	1,46 b	1,56 b	1,02 a	41,68
- Carcaça (%) -									
Rendimento	68,24	67,92	67,97	65,56	68,10	66,79	68,27	67,61	3,34
PB	22,57	21,97	21,13	21,50	22,32	21,60	22,35	21,76	9,59
EE	21,37	17,95	21,71	20,72	19,62	20,07	20,13	20,64	28,29
Gastrocnêmio	0,57	0,66	0,65	0,63	0,66	0,64	0,60	0,67	10,58
B. femoral	0,80	0,81	0,71	0,80	0,85	0,84	0,76	0,78	22,29
L. dorsi	1,34	1,56	1,38	1,38	1,37	1,42	1,40	1,40	21,67

¹ Não significativo ao teste F (P>0,05)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste SNK (P<0,05).
 Legenda: SE= animais do grupo sem estresse; EA= animais do grupo de estresse agudo; EC= animais do grupo do estresse crônico; GP= Ganho de peso; PB= Proteína Bruta; EE= Extrato Etéreo;

Os resultados quanto aos pesos relativos das vísceras apontaram uma influência do estresse realizado uma única vez antes do abate (estresse agudo). Os pesos do Trato Gastrointestinal (TGI- estômago e intestino) e do fígado apresentaram-se menores nos animais que sofreram estresse agudo em relação aos animais não estressados ou estressados de forma crônica (p<0,05) (tabela 3).

Tabela 3 Peso relativo visceral (%) de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

<i>Parâmetros</i>	<i>Períodos com Ractopamina (dias)</i> ¹					<i>Níveis de Estresse</i>			<i>CV%</i>
	0	7	14	21	28	SE	EA	EC	
-Pesos Relativos Viscerais (%)									
<i>TGI</i>	6,00	5,43	5,98	5,74	6,04	6,01 b	5,53 a	5,98 b	11,35
<i>Fígado</i>	2,65	2,49	2,50	2,51	2,53	2,58 b	2,47 a	2,60 b	7,47
<i>Baço</i>	0,19	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,18	0,19	10,74
<i>Coração</i>	0,34	0,31	0,33	0,32	0,33	0,33	0,32	0,33	11,58
<i>Rins</i>	0,72	0,73	0,71	0,73	0,71	0,73	0,70	0,73	11,12
<i>Reprodutor</i>	2,57	2,45	2,83	2,67	2,57	2,56	2,63	2,67	14,72

¹ Não significativo ao teste F (P>0,05)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste SNK (P<0,05).
 Legenda: SE= animais do grupo sem estresse; EA= animais do grupo de estresse agudo;
 EC= animais do grupo do estresse crônico; TGI= Trato gastrointestinal

Os parâmetros sanguíneos bioquímicos: glicose, triacilglicerol, colesterol total e frações HDL e VLDL+LDL, não foram afetados pelos níveis de estresse induzidos nos animais (p>0,05). Porém, foi observado o efeito do estresse agudo em parâmetros hormonais, sendo que os animais deste grupo apresentaram maiores níveis plasmáticos de corticosterona quando comparados com aqueles do grupo controle ou do estresse crônico (p<0,05) (tabela 4).

Tabela 4 Parâmetros sanguíneos de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.

	<i>Períodos com Ractopamina (dias)</i> ¹					<i>Níveis de Estresse</i>			<i>CV%</i>
	0	7	14	21	28	SE	EA	EC	
-Parâmetros Bioquímicos (mg/dL)-									
<i>Glicose</i>	133,27	117,55	124,03	127,02	131,79	122,99	127,69	129,51	31,61
<i>TAG</i>	74,65	51,22	49,56	84,51	52,23	58,31	76,68	51,28	38,81
<i>Co.t</i>	99,69	97,34	98,46	101,39	114,24	114,85	92,96	98,86	56,66
<i>HDL</i>	50,81	48,13	48,52	47,69	47,19	51,53	47,48	46,39	17,27
<i>VL+LDL</i>	40,37	40,58	41,44	42,17	52,54	47,26	37,52	45,45	55,42
-Parâmetros Hormonais (ng/ml)-									
<i>Insulina</i>	0,57	0,60	0,61	0,59	0,62	0,65	0,54	0,60	19,98
<i>Cort.</i>	344,66	267,95	321,39	362,58	343,79	274,93 ^a	358,30 ^b	278,1 ^a	22,67

¹ Não significativo ao teste F (P>0,05)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste SNK (P<0,05).
 Legenda: SE= animais do grupo sem estresse; EA= animais do grupo de estresse agudo;
 EC= animais do grupo do estresse crônico; TAG= Triacilgliceróis; Co.t= colesterol total;
 Cort.=Corticosterona

A quantidade da proteína GLUT-4 no tecido adiposo epididimário dos ratos foi afetada simultaneamente pelos períodos de adição de RAC na dieta e pela indução ao estresse crônico, havendo, portanto, uma interação entre os dois tratamentos. Os resultados demonstram maior quantidade de GLUT-4 em animais que receberam RAC por 14 e 28 dias e foram submetidos a estresse crônico (p<0,05) (Tabela 5). Esses resultados indicaram um aumento da expressão de GLUT-4 no tecido adiposo de animais estressados em relação aos não estressados nos referidos períodos. Para os animais desse grupo, observou-se ainda que a quantidade da proteína foi diretamente proporcional aos períodos de tratamento com RAC, ou seja, quanto maior o período de consumo de RAC em

animais estressados cronicamente, maior a quantidade de GLUT-4 no tecido (Gráfico 1). A figura 7 mostra o autorradiograma representativo das bandas de 54 KDa da proteína GLUT-4 juntamente com as bandas de 55 KDa da proteína α -tubulina, nos tecidos adiposos epididimários dos ratos.

Tabela 5 Quantificação da proteína GLUT-4 no tecido adiposo de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a estresse crônico.

Estresse	<i>Períodos de tratamento com Ractopamina (dias)</i>				
	0	7	14	21	28
- GLUT- 4 -					
<i>sem</i>	1,46	1,72	1,07 a	1,41	1,37 a
<i>Crônico</i> ¹	1,42	1,19	2,03 b	1,59	2,35 b
<i>CV (%)</i>	16,88				

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F (P<0,05)

¹Regressão linear significativa (P<0,05)

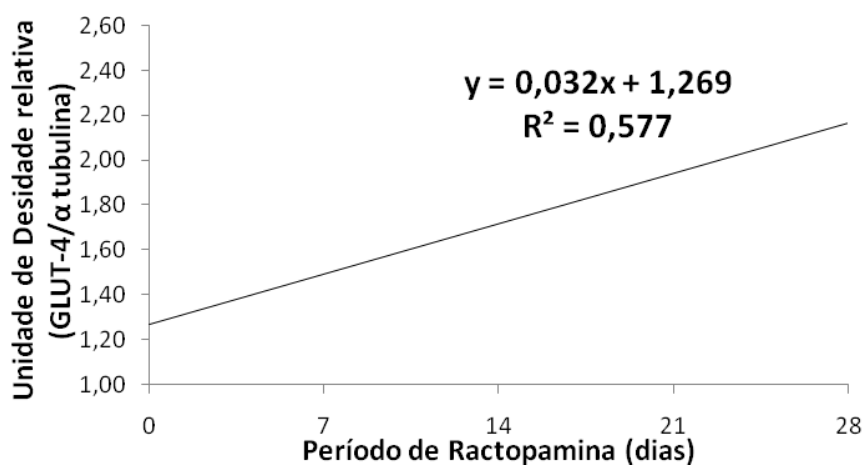


Gráfico 1 Variações da quantidade de GLUT-4 no tecido adiposo epididimário conforme os diferentes períodos de tratamento com ractopamina (RAC), para animais submetidos a estresse crônico

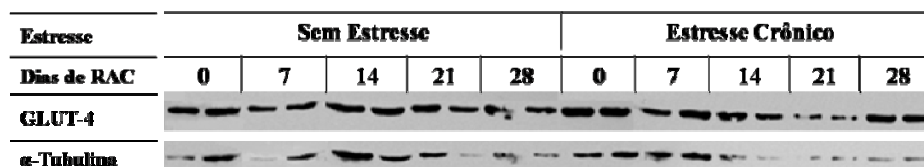


Figura 7 Autorradiograma representativo de *western blotting* para a proteína GLUT-4 e α -tubulina no tecido adiposo epididimário de ratos recebendo 5 ppm de Ractopamina (RAC)

Quanto ao comportamento dos animais, o Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE) indicou uma interação dos diferentes períodos de RAC com os níveis de estresse ($p < 0,05$) (Tabela 6). Observou-se um desempenho semelhante quanto ao número de entradas (Gráfico 2) e o tempo de permanência (Gráfico 3) nos braços abertos do labirinto para os animais que não receberam RAC na dieta. No entanto, na medida em que se elevaram os períodos de fornecimento de RAC, observou-se que os animais estressados (tanto crônico, como agudo) aumentaram o número de entradas nos braços abertos (Gráfico 2) e que os animais sob estresse agudo elevaram o tempo de permanência nesses braços (Gráfico 3). Por outro lado, os animais que não foram submetidos ao estresse tiveram uma redução de entradas (Gráfico 2) e de tempo de permanência (Gráfico 3) nesse braço proporcional ao aumento nos intervalos de tempo de consumo de RAC. Ainda, foi observado para o grupo do estresse crônico, que os períodos de fornecimento de RAC não influenciaram o tempo que esses animais permaneceram nos braços abertos do labirinto (Gráfico 3).

Tabela 6 Parâmetros comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado pelos ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

<i>Níveis de Estresse</i>	<i>Períodos com Ractopamina (dias)</i>				
	0	7	14	21	28
<i>- Número de Entradas nos braços abertos ¹-</i>					
<i>Sem Estresse</i>	0,4	1,0	0,6	0,0	0,4
<i>Estresse Crônico</i>	0,6	0,8	0,8	0,6	2,0
<i>Estresse Agudo</i>	0,8	0,6	1,0	1,8	0,6
<i>- % Tempo de Permanência nos braços abertos ¹-</i>					
<i>Sem Estresse</i>	6,1	13,2	7,5	0,8	24,7
<i>Estresse Crônico</i>	10,6	8,7	5,9	12,3	4,0
<i>Estresse Agudo</i>	3,1	4,7	7,5	0,0	2,8

¹Interação significativa pela Análise de *Deviance* ($P < 0,05$). Modelo de regressão ajustado: modelo de intercepto comum. Legenda: SE= animais do grupo sem estresse; EA= animais do grupo de estresse agudo; EC= animais do grupo do estresse crônico.

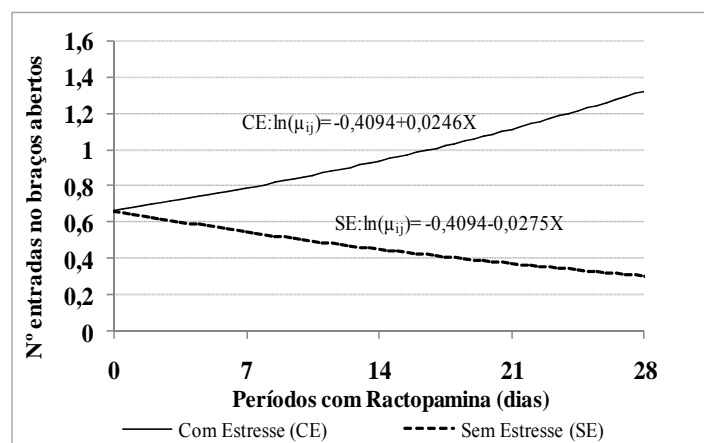


Gráfico 2 Variações dos números de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado conforme os diferentes períodos de tratamento com ractopamina (RAC), para animais do grupo sem e com estresse (agudo e crônico). Grupos Estresse Agudo e Crônico ajustados para uma única equação pela Análise de *Deviance*

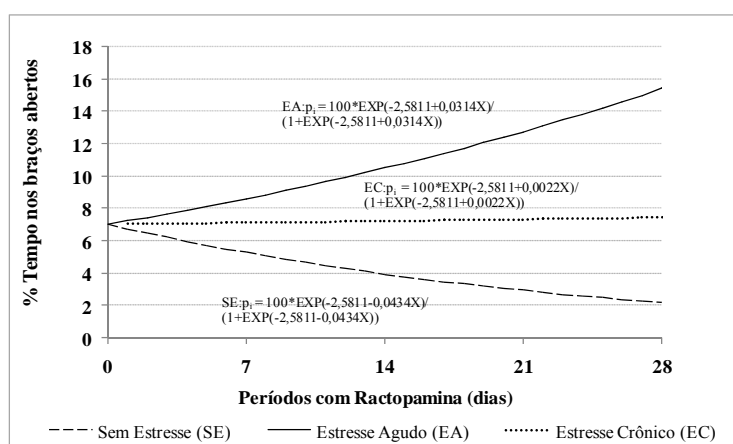


Gráfico 3 Variações de tempo de permanência nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado conforme os diferentes períodos de tratamento com ractopamina (RAC), para animais do grupo sem estresse, estresse agudo e estresse crônico

O número de entradas nos braços fechados, outro parâmetro testado no labirinto, não foi influenciado pelos períodos de RAC na dieta ($p > 0,05$), mas,

sim pelo estresse ($p < 0,05$). Dessa forma, aqueles animais submetidos às situações estressantes (estresse agudo ou crônico) entraram menos nos braços fechados, mostrando um menor índice locomotivo em comparação ao grupo sem estresse. Outras variáveis comportamentais complementares, como o número de vezes que os animais chegam ao centro do labirinto, sem ultrapassá-lo e o número de vezes que alcançam o fim dos braços abertos não foram afetados pelos tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 Parâmetros comportamentais de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse, no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

<i>Parâmetros</i>	<i>Períodos com Ractopamina (dias)¹</i>					<i>Níveis de Estresse</i>		
	0	7	14	21	28	SE	EA	EC
<i>- Locomoção no LCE -</i>								
<i>Número Entradas BF</i>	4,47	3,33	5,60	3,80	4,53	5,64 b	3,80 a	3,60 a
<i>Número vezes FBA</i>	0,07	0,13	0,07	0,07	0,27	0,04	0,24	0,08
<i>Número vezes Centro</i>	2,93	2,46	4,60	4,00	3,33	3,48	3,56	3,36

¹ Não significativo ao teste F, pela Análise de *Deviance* ($P > 0,05$)

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste X^2 de Wald ($P < 0,05$)
 Legenda: SE= animais do grupo sem estresse; EA= animais do grupo de estresse agudo; EC= animais do grupo do estresse crônico; BF=Braço Fechado; FBA= Chegada no fim dos braços abertos

6 DISCUSSÃO

Geral

Modelos experimentais são úteis para simular mecanismos fisiológicos e patológicos *in vivo*, possibilitando extrapolações para outras espécies, devido à questões éticas, financeiras e/ou questões de gestão de instalações ou falta de espaço físico (DAMATTA, 2010; FAGUNDES; TAHA, 2004). Algumas diferenças fisiológicas e metabólicas podem ocorrer entre a espécie estudada e a espécie alvo. Como o presente estudo almeja-se a otimização da produção de suínos, algumas diferenças e semelhanças dos tratamentos e resultados para ambas espécies foram discutidas.

Algumas das variáveis analisadas não apresentaram respostas diferenciadas aos tratamentos com RAC, tais como, desempenho, características de carcaça, pesos relativos viscerais e parâmetros sanguíneos. Esses resultados sugerem que a dosagem utilizada não foi suficiente para causar tais alterações, ou que a dose ingerida na dieta sofreu uma metabolização de primeira passagem no fígado (SMITH; PAULSON, 1994), ou ainda que o evento de *down-regulation* de receptores β -adrenérgicos pode ter ocorrido (LIU et al., 1994).

A opção pelo tratamento com a dose de 5 ppm de RAC, se baseou no estudo de Ferreira et al. (2011) em suínos, nos quais os autores estimaram o ponto ótimo de tratamento com este aditivo entre 4,09 a 5,14 ppm, havendo um aumento de 6,09% no índice de bonificação, sendo esta, uma variável econômica de produção descrita por Guidoni (2000), quando utilizado o nível de 5 ppm de RAC. Por outro lado, em ratos pode ser observada uma maior eficiência da RAC administrada intraperitoneal, quando comparada com o fornecimento por via oral (SMITH; PAULSON, 1994). Entretanto, este estudo optou pela administração oral visando à extrapolação para a produção de suínos, uma vez que o tratamento via parenteral é inviável para tal espécie. Apesar de a dose ser

considerada inferior ao preconizado em ratos, optou-se pela avaliação dos efeitos acumulativos de doses administradas em períodos crescentes de fornecimento de RAC. Este fato se justifica como uma tentativa de se evitar a diminuição da sensibilidade dos receptores e não o ajuste de dosagens, uma vez que Liu et al. (1994) reportaram limitações do efeito de altas doses RAC para suínos devido ao acúmulo desse agonista. Em altas doses, a RAC pode gerar *down-regulation* dos receptores adrenérgicos, mecanismo pelo qual a intensidade da resposta mediada se reduz. Esse evento tem grande importância no presente estudo, uma vez que o incremento de catecolaminas endógenas provocadas pelo estresse pode ter sido o responsável pela neutralização de seus efeitos em animais estressados.

Desempenho e Carcaça

A adição de RAC na dieta dos animais não influenciou as variáveis relativas ao desempenho e às características de carcaça, como descrito no presente estudo. Todavia, é possível observar certas alterações nesses parâmetros a partir da utilização de ABAs. Alguns agonistas como o clenbuterol, o fenoterol, o cimaterol e a RAC (via intraperitoneal) aumentaram o consumo, o ganho de peso, o teor de proteína corporal e o pesos de músculos em ratos (EADARA et al., 1989; EMERY et al., 1984), sendo possível observar até uma redução no tecido adiposo da carcaça por meio da administração da RAC intraperitoneal (RICKE et al., 1999). No entanto, a RAC administrada por via oral não provocou efeitos na ingestão de alimentos, no ganho de peso corporal, na eficiência alimentar, na composição corporal e nos pesos musculares de camundongos, como descrito por Page et al. (2004). Tal fato demonstra que a administração oral da RAC em ratos pode não causar efeitos no crescimento e eficiência alimentar como aqueles encontrados quando esta é administrada por via intraperitoneal. Dessa forma, apesar de a absorção oral ter

se mostrado alta, no estudo de Smith e Paulson (1994), sugeriu-se que a RAC se torna menos disponível na corrente sanguínea devido ao metabolismo de primeira passagem no fígado de ratos. Assim, a administração oral de RAC resulta em rápida transformação da mesma em metabólitos inativos diminuindo significativamente sua biodisponibilidade. Ainda, para a administração por via oral, a dose utilizada se torna um fator limitante para a obtenção dos efeitos desejados. Os achados de Dubrovin, Liu e Mills (1990) corroboram essa informação, pois se observou que a RAC na dose de 500 mg/litro, adicionada na água dos bebedouros, causou um aumento no ganho de peso, não havendo o mesmo ganho para a dose de 50 mg/litro. No entanto, existem diferenças entre ratos e suínos, principalmente relacionadas à farmacocinética desse agonista e às subpopulações de receptores. Sendo assim, em suínos, a RAC pode elevar o ganho de peso e melhorar as características de carcaça dos animais, mesmo quando esta é fornecida por via oral (HALSEY et al., 2011; MARCHANT-FORDE et al., 2003; UTTARO et al., 1994).

Diferentemente da RAC, a exposição a situações de estresse promoveu alterações sobre o desempenho dos animais. O menor ganho de peso observado no grupo de animais que foram submetidos a estresse crônico corrobora o estudo de Ricart-Jané et al. (2002). Os autores indicaram ainda, que o estresse induziu à menor ingestão de alimentos, levando conseqüentemente à diminuição do crescimento em ratos. No entanto, no presente estudo houve uma manutenção do consumo dos animais sob estresse, sugerindo que o menor ganho de peso deveu-se a outros processos metabólicos. Segundo McEwen (2000), elevados níveis de catecolaminas e glicocorticoides tendem mobilizar e reconstituir reservas de energia necessárias para o cérebro e para as funções corporais em desafio. Essas adaptações são essenciais para manter o metabolismo e a temperatura corporal e podem reduzir os ganhos no organismo sob desafio. Com relação aos suínos, a adição de RAC na dieta, combinada com algumas situações estressantes como

manejo e transporte não alterou o consumo dos animais. Apesar das condições de estresse, o fornecimento do agonista na dieta foi capaz de elevar o ganho de peso, a área de lombo e a porcentagem de carne magra nessa espécie (MARCHANT-FORDE et al., 2003).

Vísceras

Assim como para variáveis relacionadas ao desempenho e a carcaça dos animais, os pesos relativos das vísceras não foram afetados pela adição de RAC na dieta, mas sim pela indução ao estresse. A utilização de diferentes tipos de protocolos para ABA também não foram capazes de afetar esses parâmetros. Desse modo, os pesos de coração, rins e fígado não foram afetados pelos tratamentos com clenbuterol oral (200 ppm) (PAGE et al., 2004) ou intraperitoneal (2 mg/kg/dia), com fenoterol (intraperitoneal, 2 mg/kg/dia) (EMERY et al., 1984) e com a RAC (200 e 800 ppm) (PAGE et al., 2004). Adicionalmente, não foram encontradas alterações nos pesos das vísceras de ratos utilizando o cimaterol (EADARA et al., 1989) ou mesmo a RAC pela via intraperitoneal (RICKE et al., 1999).

Da mesma forma, suínos tratados com RAC não tiveram alterações em seus pesos viscerais (BARK et al., 1992; DUNSHEA et al., 1993; GONZALEZ et al., 2010). No entanto, o presente estudo encontrou alterações quanto a esses parâmetros em animais estressados. Foi observado no experimento, menor peso para parte do trato gastrintestinal (estômago e intestino) e fígado dos animais submetidos a estresse agudo. Este fato poder ser possivelmente explicado por um menor fluxo sanguíneo nessas vísceras. O sistema nervoso simpático tem a capacidade de realizar uma descarga em massa após situações de estresse. Este fato resulta na reação generalizada por todo corpo que é conhecida como resposta de alarme ou resposta de estresse, cujo objetivo é fornecer ativação para luta ou fuga. Essa descarga em massa aumenta a capacidade do corpo de

desempenhar atividade muscular vigorosa. Para que isso ocorra, o organismo utiliza alguns recursos, tais como: aumento do fluxo sanguíneo para os músculos ativos concomitante com fluxo sanguíneo diminuído para órgãos tais como trato gastrointestinal e rins que são dispensados na atividade motora rápida (GUYTON; HALL, 2010).

Yeh et al. (2012) estudaram as alterações na microcirculação sanguínea durante o processo cirúrgico, observando que tal situação foi capaz ativar o sistema nervoso simpático. Segundo os autores, os níveis mais elevados de estresse, estimulados pela dor e por utilização de anestésias, causaram uma vasoconstrição esplênica e intestinal em ratos. Tais alterações sugerem uma ampla distribuição de subtipos dos receptores β -agonistas nos diversos tecidos e vísceras. McNeel e Mersmann (1999) encontraram os subtipos de receptores β 1 e β 2 distribuídos em vários órgãos como coração, pulmão e fígado. Adicionalmente, Roberts et al. (1999) verificaram em regiões do trato gastrointestinal de ratos não só os subtipos β 1 e β 2, como também receptores do tipo β 3. Essas informações corroboram os resultados do presente estudo, no qual o menor peso das vísceras pode ser atribuído a uma redução em seu fluxo sanguíneo, mediada pelos receptores durante o estresse agudo.

Além disso, a ativação do sistema nervoso autônomo pode modificar o fluxo simpático para o tecido adiposo marrom, sendo essa resposta mediada por fatores relacionados com o fator de libertação de corticotropina (CRF) (ROTHWELL; STOCK, 1984). O estudo de Lefevre, Rothwell e Stock (1987) demonstrou que a administração central de CRF e de noradrenalina estimularam a termogênese no tecido adiposo marrom de ratos.

Sendo assim, o desvio do fluxo sanguíneo das vísceras pode ser tanto para os tecidos musculares, como para aquele tecido adiposo destinado ao controle da temperatura, já que o estresse pode aumentar não só os níveis de catecolaminas, como também a liberação de CRF no hipotálamo desses animais,

resultando no aumento dos níveis de corticosterona plasmática, visto no presente estudo.

Tecido Adiposo

Diferente das variáveis discutidas anteriormente, a quantidade de transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT-4) no tecido adiposo epididimal dos animais variou devido ao fornecimento da RAC concomitante a indução ao estresse. Dessa forma, observou-se um aumento da expressão de GLUT-4 no tecido adiposo para os períodos 14 e 28 dias, nos animais submetidos a estresse, e um aumento diretamente proporcional dessa proteína com relação aos períodos de consumo de RAC naqueles estressados cronicamente. Tais achados indicaram uma interferência do estresse nas ações da RAC, com relação ao metabolismo lipídico.

O efeito dessa interação antagoniza àquele esperado pela RAC, sugerindo um aumento da lipogênese nos animais sob estresse crônico. Dessa forma, a ocorrência do aumento de catecolaminas devido às condições estressantes pode ter gerado uma *down-regulation* dos receptores β -adrenérgicos. Tal situação pode ter promovido uma redução de ligações da RAC nesses receptores, ocasionando, conseqüentemente, uma maior quantidade de GLUT-4 no tecido desses animais. No entanto, alguns estudos mostram que o uso de ABA pode reduzir o tecido adiposo e aumentar a apoptose de suas células, embora tais mecanismos ainda sejam desconhecidos. Os tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal de camundongos foram reduzidos com 800 ppm de RAC e 200 ppm de clenbuterol (PAGE et al., 2004). Outro ABA, o cimaterol, também demonstrou ser capaz de reduzir o peso do tecido adiposo abdominal. A adição tanto de 10 quanto de 100 ppm desse fármaco na dieta de ratos foi eficiente, sendo esta redução diretamente proporcional a dose administrada (EADARA et al., 1989). Apesar da capacidade desses agonistas em

reduzir a gordura corporal, observou-se que o clenbuterol aumentou a taxa de captação de glicose e melhorou a resposta à insulina pela gordura abdominal (PAN et al., 2001).

Dessa forma, o aumento da captação de glicose nesse tecido, como indicado pelo aumento da proteína carreadora de glicose GLUT-4 no presente trabalho, não sugeriu necessariamente um aumento do tecido adiposo na região intraperitoneal, bem como na carcaça. Tal observação corrobora com a ausência de diferenças nas respostas entre os tratamentos quanto à composição de extrato etéreo na carcaça, apresentada nesse estudo.

Por outro lado, em suínos, com relação ao tecido adiposo, foi possível verificar a influência da RAC na expressão de genes lipogênicos envolvidos com a via do Adenosina Monofosfato cíclico (AMPc), desse modo, 60 ppm do agonista foi eficiente para reduzir FAS e GLUT-4 no tecido adiposo desses animais (HALSEY et al., 2011). Efeitos *in vitro* (DUBROVIN; LIU; MILLS, 1990; HAUSMAN et al., 1989) demonstraram que a RAC tem resposta concentração-dependente sobre a responsividade e a sensibilidade à insulina no tecido adiposo. Segundo Hausman et al. (1989), a capacidade de resposta e a sensibilidade à insulina em adipócitos de ratos foram reduzidas na presença de RAC e isoproterenol. Além disso, a RAC foi potente em estimular a lipólise e inibir a lipogênese em adipócitos isolados de ratos mesmo sem a presença de insulina. Dessa forma, o seu estudo sugeriu que as mudanças induzidas pela RAC, no metabolismo lipídico estimulado pela insulina, podem ser tanto por meio de alterações no nível de receptores de insulina, quanto por perturbações pós-receptor (HAUSMAN et al., 1989). Esse efeito pode ser explicado pelo fato da RAC, assim como outras catecolaminas, induzirem suas alterações por meio de mecanismo dependente do AMPc (SMITH; KURODA; SIMPSON, 1984).

Porém, ainda com relação aos receptores de insulina, pode haver diferentes respostas entre os tratamentos *in vitro* e *in vivo*. A exposição *in vitro* à

RAC e ao clenbuterol reduziu em 20-30% a ligação da insulina em adipócitos de ratos, devido a uma diminuição na concentração dos receptores de insulina. Por sua vez, o tratamento *in vivo* com ambos agonistas, clenbuterol e RAC (500 mg/litro), reduziu o peso do tecido adiposo dos membros posteriores dos animais, mas tendeu a aumentar a ligação desse tecido à insulina. No entanto, esses efeitos não foram observados com menores doses de RAC (50 mg/litro) (DUBROVIN; LIU; MILLS, 1990). O presente estudo corrobora com esse fato, pois a dose de 5 ppm de RAC fornecida por diferentes períodos não alterou a quantificação de GLUT-4 no tecido adiposo dos animais sem estresse.

Parâmetros Sanguíneos

A GLUT-4 é uma proteína transportadora de glicose insulino-dependente. Após a estimulação pela insulina, esses transportadores são translocados das vesículas citoplasmáticas para a membrana e o transporte de glicose é aumentado. No presente estudo não foi encontrada diferença quanto à concentração plasmática de insulina. Os ABAs apresentam diferentes respostas quanto aos níveis de insulina. Alguns agonistas como o clenbuterol (2 mg/kg/dia, sub-cutâneo) utilizado por 16 dias e o cimaterol (10 e 100 ppm, oral) durante uma semana não afetaram os níveis de insulina plasmáticos (EADARA et al., 1989; EMERY et al., 1984), porém, outros como o fenoterol (2 mg/kg/dia, sub-cutâneo) utilizado por 19 dias (EMERY et al., 1984) e o clenbuterol (1 mg/kg/dia, oral) utilizado durante 5 semanas (PAN et al., 2001) reduziram o nível plasmático do hormônio (EMERY et al., 1984; PAN et al., 2001). Mesmo mantendo ou reduzindo os níveis de insulina foi possível observar a redução no tecido adiposo abdominal (EADARA et al., 1989; PAN et al., 2001), indicando que as alterações encontradas no metabolismo lipídico realmente não estão relacionadas às ações diretas sobre esse hormônio, mas sim por ação antagônica a ele. Já o nível de outro hormônio, a corticosterona, não foi alterado pela RAC

nesse trabalho e nem pelo cimaterol, como apresentado por Eadara et al. (1989). Tais resultados também foram verificados em suínos tratados com RAC, nos quais as concentrações circulantes de cortisol, hormônio similar a corticosterona em ratos, não diferiram entre os tratamentos (MARCHANT-FORDE et al., 2003).

O estresse por sua vez, pode trazer alterações em parâmetros sanguíneos hormonais. No estudo em questão não houve diferença entre os animais quanto ao nível de insulina, porém para a corticosterona houve diferentes respostas de acordo com os diferentes níveis de estresse. Outros estudos corroboram os presentes resultados, pois utilizando modelos de imobilização semelhantes às mesmas alterações na corticosterona plasmática de ratos foram encontradas. Dessa forma, observou-se maiores níveis circulantes do hormônio em animais sob estresse crônico e sub-crônico quando comparados àqueles não estressados (GAMEIRO et al., 2006) e níveis maiores ainda nos animais sob estresse agudo (GAMEIRO et al., 2006; RICART-JANÉ et al., 2002). Adicionalmente, o estresse agudo também promoveu um aumento nos níveis de ACTH tanto em relação aos animais controle, como em relação aos animais do estresse crônico ou sub-crônico, mostrando-se mais potente nessas alterações hormonais (GAMEIRO et al., 2006). No presente estudo, porém, não foi observada diferença de resposta para corticosterona entre os animais do grupo estresse crônico em relação ao grupo controle, tal fato pode ser devido ao tempo decorrido entre a indução desses animais a imobilização e a coleta do material, já que antes da eutanásia eles ainda foram submetidos ao TLCE. Já suínos tratados com RAC e submetidos ao manejo de transporte, um potencial causador de estresse, apresentaram concentrações mais elevadas de epinefrina e norepinefrina, no entanto, sem alterações nos níveis de cortisol (MARCHANT-FORDE et al., 2003).

Apesar da indução ao estresse ser um potencial causador de mudanças em alguns parâmetros sanguíneos bioquímicos (RICART-JANÉ et al., 2002), não foram observadas alterações nos níveis de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e suas frações HDL (*High-Density Lipoprotein*) e VLDL+LDL (*Very Low Density Lipoprotein+Low Density Lipoprotein*) nos ratos. Em humanos, tanto o estresse agudo quanto o crônico aumentam os níveis de colesterol plasmático. Os principais efeitos são encontrados no estresse crônico, ou seja, o colesterol total circulante aumenta significativamente. Este fato ocorre normalmente porque o estresse aumenta a liberação de catecolaminas que estimulam a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima (HMG-CoA), aumentando assim, a síntese de colesterol total, como sugere Ricart-Jané et al. (2002). Em ratos, a ausência de respostas diferentes ao estresse agudo corroboram os achados de Ricart-Jané et al. (2002), no qual esse nível de estresse também não foi suficiente para alterar os parâmetros lipoprotéicos como o colesterol e sua fração HDL.

Comportamento

O TLCE do presente estudo apontou alterações nas respostas de ratos submetidos a estresse e suplementados com RAC. Outros trabalhos indicaram alterações no comportamento e fisiologia de animais submetidos aos ABAs. Tais efeitos podem ser resultantes da ativação de receptores β -adrenérgicos no Sistema Nervoso Central, mais especificamente no córtex e cerebelo, como descreveu O'Donnell (1988). O autor sugeriu uma relação entre a ativação desses receptores com o comportamento de animais, constatando alterações comportamentais sob efeito do clenbuterol. Além do córtex e cerebelo, Nomura et al. (1981) observaram a presença de sítios de ligação dos agonistas β -adrenérgicos em outras áreas cerebrais, tais como: hipotálamo, mesencéfalo, hipocampo e tálamo, ponte e medula oblonga. Adicionalmente, segundo

Gameiro et al. (2006), o estresse pode aumentar significativamente o comportamento de ansiedade e de nocicepção em ratos.

No presente estudo foi observada uma interação entre a RAC e o estresse. O aumento nos períodos de RAC produziu efeitos contrários no grupo com estresse em relação aos não estressados. Assim, quanto maior o número de dias de fornecimento de RAC, maior foi o número de entradas nos braços abertos para os animais estressados, maior foi a permanência nestes para aqueles sob estresse agudo e menor foi o número de entradas e a permanência para aqueles sem estresse. Esses resultados sugerem que a RAC por si só reduziu o comportamento de exploração dos animais, mas quando associada ao estresse esse parâmetro foi elevado. Entretanto, não foram observados os mesmos efeitos de interação entre RAC e estresse quanto ao tempo nos braços abertos, para aqueles animais sob estresse crônico. Os animais desse grupo responderam ao estresse, mas não aos diferentes períodos de RAC. Segundo Nomura et al. (1981), o estresse induzido de forma crônica nos ratos aumenta os níveis de norepinefrina intra-sinápticos, podendo provocar uma sub-sensibilidade do receptor β -adrenérgico no córtex cerebral, devido a uma diminuição em seu número. Sendo assim, os efeitos da RAC para esse grupo podem ter sido neutralizados devido a uma *down-regulation* desses receptores.

Gorman e Dunn (1993) avaliaram o comportamento de camundongos sob o efeito do estresse por restrição (imobilização). Os autores constataram que os animais submetidos ao estresse ficaram menos tempo dentro de câmaras (tubos cilíndricos galvanizados) e mais tempo na área aberta, apresentando uma redução no comportamento de defesa em relação ao ambiente. O achado é condizente com o presente resultado, no qual o maior número de saídas dos animais para os braços abertos e maior permanência nestes sugeriu também um comportamento menos defensivo, devido à interação da RAC com o estresse. Essa combinação pareceu ser capaz de inibir o medo e elevar o comportamento

expansivo nos animais, deixando-os até mais ofensivos. Efeitos semelhantes foram observados em suínos alimentados com RAC e submetidos às situações de estresse, como manejo e transporte. Dessa forma, nas primeiras semanas do ensaio os animais passaram mais tempo ativos e em alerta e menos tempo deitados em decúbito lateral (MARCHANT-FORDE et al., 2003). Os achados de Flicker e Geyer (1982) ratificam essas informações ao indicar que a infusão de norepinefrina no hipocampo de ratos tende a aumentar o comportamento exploratório de uma maneira que é antagonizada pelo propranolol.

Diferentemente do estudo atual, Gameiro et al. (2006) e Gorman e Dunn (1993) verificaram que o estresse isoladamente foi capaz de reduzir o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). Gorman e Dunn (1993) não encontraram diferenças no tempo médio em que os animais permaneceram nestes braços, porém Gameiro et al. (2006) constataram que este foi reduzido. Os efeitos do isoproterenol, um ABA, também foram estudados no comportamento de ratos. O isoproterenol aumentou o tempo de latência dos animais (tempo que gastavam para sair de um cilindro, onde eram colocados). Tais efeitos foram dose-dependentes, ou seja, quanto maior a dose de isoproterenol maior era o tempo de permanência dentro dos cilindros e maior era a demora para sair (GORMAN; DUNN, 1993). Tal resultado condiz com o que foi verificado para os animais que foram submetidos somente a RAC, pois tal grupo teve uma redução nas entradas nos braços abertos proporcional ao aumento nos períodos de administração de RAC.

Apesar das respostas para os braços abertos do labirinto, a RAC não produziu alterações quanto às entradas nos braços fechados. A exposição ao estresse, entretanto, foi capaz de provocar uma redução nesse parâmetro. Porém, no estudo de Gameiro et al. (2006) em ratos submetidos a diferentes períodos de estresse por imobilização, semelhantes aos utilizados no atual estudo, não foram encontradas diferenças significativas para as entradas nesses braços. O número

de entradas nos braços fechados pode ser analisado como um parâmetro de locomoção dos animais. Dessa forma, o resultado do presente estudo sugeriu que o estresse, diferentemente da RAC, foi capaz de reduzir a atividade locomotora dos animais. Apesar disso, Bisagno et al. (2004) constataram que o estresse crônico por si só pode não alterar o nível de locomoção dos animais. Segundo o autor, as sessões de estresse por restrição combinado com anfetamina podem ainda aumentar esse parâmetro.

Segundo Marchant-Forde et al. (2003), suínos alimentados com RAC e submetidos a situações estressantes, como manejo e transporte, apresentaram maior atividade nas primeiras semanas do ensaio, comportamento semelhante àquele visto nos braços abertos do LCE, para os animais do presente trabalho. No entanto, nas semanas seguintes do estudo, os autores constataram que os animais saíram menos da baía de forma voluntária, levaram mais tempo para se retirarem das baias, levou-se também mais tempo no manejo de pesagem, necessitando de mais palmadas e empurrões do manipulador para entrarem na balança. Tal comportamento dos animais se assemelha aos dos ratos quanto ao parâmetro de locomoção (entradas nos braços fechados), pois assim como o estresse incitado aos ratos, a RAC associada a alguns manejos estressantes podem reduzir a atividade locomotora dos suínos. Portanto, os resultados sugerem que o estresse, somado ou não à administração de RAC, bem como de outros ABAs, pode afetar o comportamento dos animais, tornando-os potencialmente mais ofensivos e suscetíveis à manipulação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dose de 5 ppm de RAC via oral, apesar de suficiente para suínos, provocou efeitos menos pronunciados em ratos, sugerindo uma metabolização de primeira passagem no fígado dessa espécie. Porém, a opção pela dose foi uma tentativa de se evitar a diminuição da sensibilidade dos receptores, objetivando a avaliação dos efeitos pelo incremento no tempo de fornecimento de RAC. Mesmo nessa dosagem, a RAC potencializou os efeitos do estresse em ratos. E ao extrapolar para animais de produção, sugere-se que o estresse pode atuar negativamente nos possíveis benefícios oferecidos pela RAC.

8 CONCLUSÃO

Os períodos de RAC associados ao estresse crônico interferiram de forma período-dependente na expressão da proteína GLUT-4 no tecido adiposo. Também houve uma interação entre a RAC e o estresse no comportamento dos animais. Assim, os períodos de RAC combinados ao estresse elevaram a exploração no labirinto de forma período-dependente, efeito antagônico àquele verificado quando a RAC foi fornecida aos animais não estressados.

O estresse foi capaz de interferir no comportamento, desempenho e metabolismo dos ratos. Os animais estressados apresentaram uma redução na atividade locomotora no labirinto. O estresse agudo reduziu o aporte sanguíneo para algumas vísceras e elevou o nível do hormônio corticosterona. O estresse crônico, por sua vez, foi capaz de prejudicar o ganho de peso dos animais, mas não foi eficiente em alterar outros parâmetros, como àqueles vistos para o nível agudo.

REFERÊNCIAS

- ADEOLA, O. et al. Manipulation of porcine carcass composition by ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 11, p. 3633-3641, Nov. 1990.
- ADEOLA, O.; MCBRIDE, B. W.; YOUNG, L. G. Metabolic responses induced by isoproterenol in ractopamine-fed pigs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, n. 6, p. 1280-1286, June 1992.
- APPLE, J. K. et al. Effects of dietary lysine and energy density on performance and carcass characteristics of finishing pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 3277-3287, Nov. 2004.
- ARMSTRONG, T. A. et al. Effects of ractopamine step-up use programs on finishing pigs fed under commercial conditions. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 13, n. 2, p. 66-71, Apr. 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. 1230 p.
- BABIJ, P.; BOOTH, F. W. Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in atrophying rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 254, n. 5, p. C657-660, 1988.
- BARK, L. J. et al. Influence of genetic capacity for lean tissue growth on rate and efficiency of tissue accretion in pigs fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3391-3400, Nov. 1992.
- BEERMANN, D. H. et al. Cimaterol induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 65, n. 6, p. 1514-1524, Dec. 1987.

BISAGNO, V. et al. Chronic stress alters amphetamine effects on behavior and synaptophysin levels in female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 78, n. 3, p. 541-550, July 2004.

BOLER, D. D. et al. Effect of ractopamine hydrochloride (Optaflexx) dose on live animal performance, carcass characteristics and tenderness in early weaned beef steers. **Meat Science**, Barking, 2012. In press.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal, suas indicações e restrições**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

BRIDI, A. M. et al. Efeito do genótipo halotano, da ractopamina e do sexo do animal na qualidade da carne suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 2027-2033, set./out. 2006.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFISKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1089-1098, July 2009.

CANTARELLI, V. S. et al. Características da carcaça e viabilidade econômica do uso de cloridrato de ractopamina para suínos em terminação com alimentação à vontade ou restrita. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 844-851, maio/jun. 2009.

CASTEILLA, L. et al. Expression of β 1- and β 3-adrenergic-receptor messages and adenylatecyclase β -adrenergic response in bovine perirenal adipose tissue during its transformation from brown into white fat. **Biochemical Journal**, London, v. 297, n. 10, p. 93-97, Oct. 1994.

CATALANO, D. et al. Physiopathological changes related to the use of ractopamine in swine: clinical and pathological investigations. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 144, n. 1/2, p. 74-81, Mar. 2012.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 49, n. 1, p. 171-176, Sept. 1994.

DAMATTA, R. A. Animal models in biomedical research. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 210-211, 2010.

DUBROVIN, L. C.; LIU, C. Y.; MILLS, S. E. Insulin binding to mouse adipocytes exposed to Clenbuterol and ractopamine *in vitro* and *in vivo*. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 7, n. 1, p. 103-109, 1990.

DUNSHEA, F. R. et al. Interrelationships between sex and ractopamine on protein and lipid deposition in rapidly growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 2919-2930, Nov. 1993.

EADARA, J. K. et al. Effects of cimaterol, a β -Adrenergic agonist, on protein metabolism in rats. **Metabolism**, New York, v. 38, n. 9, p. 883-890, Sept. 1989.

ELY, D. R. et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 61, n. 3, p. 395-398, Mar. 1997.

EMERY, P. W. et al. Chronic effects of β -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. **Bioscience Reports**, Colchester, v. 4, n. 1, p. 83-91, Jan. 1984.

EMORINE, L. J. et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. **Science**, New York, v. 245, n. 4922, p. 1118-1121, 1989.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FERREIRA, M. S. S. et al. Cloridrato de ractopamina em dietas para suínos em terminação. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 25-32, 2011.

FLICKER, C.; GEYER, M. A. Behavior during hippocampal microinfusions: I., norepinephrine and diversive exploration. **Brain Research**, Amsterdam, v. 257, n. 1, p. 79-103, 1982.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Freedom of information**

summary. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/140863.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2012.

GAMARO, G. D. et al. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 63, n. 4, p. 693-697, Feb. 1998.

GAMEIRO, G. H. et al. Effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 82, n. 3, p. 338-344, May 2005.

_____. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 87, n. 4, p. 643-649, Apr. 2006.

GONZALEZ, J. M. et al. Effect of ractopamine-HCl supplementation for 28 days on carcass characteristics, muscle fiber morphometrics, and whole muscle yields of six distinct muscles of the loin and round. **Meat Science**, Barking, v. 85, n. 3, p. 379-384, July 2010.

GORMAN, A. L.; DUNN, A. J. Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 45, n. 1, p. 1-7, May 1993.

GU, Y. et al. Effects of ractopamine, genotype and growth phase on finishing performance and carcass value in swine: II., estimation of lean growth rate and lean feed efficiency. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 7, p. 2694-2702, July 1991.

GUIDONI, A. L. Melhoria de processos para a tipificação e valorização de carcaças suínas no Brasil. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 1., 2000, Concórdia. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2000. p. 221-234.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2010. 1014 p.

HALL, J. M. et al. Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 14, n. 10, p. 376-383, Oct. 1993.

HALSEY, C. H. C. et al. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1011-1019, Apr. 2011.

HAUSMAN, D. B. et al. Isolated rat adipocytes effect of ractopamine on insulin sensitivity and response of isolated rat adipocytes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 6, p. 1455-1464, June 1989.

HEIN, L.; KOBILKA, B. K. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. **Neuropharmacology**, New York, v. 34, n. 4, p. 357-366, Apr. 1995.

HOLLENGA, C.; ZAAGSMA, J. Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptors in rat adipocytes. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 98, n. 4, p. 1420-1424, Dec. 1989.

KELLY, J. A.; TOKACH, M. D.; DRITZ, S. S. Weekly growth and carcass response to feeding ractopamine (Paylean®). In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARY, 1., 2003, Perry. **Proceedings...** Perry: AASV, 2003. p. 51-58.

KIM, H. et al. Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 197-203, Sept. 2010.

KIM, Y. S. et al. Characterization of β 1- and β 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 42, n. 9, p. 1783-1789, Oct. 1991.

KIM, Y. S.; SAINZ, R. D. β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. **Life Sciences**, Varsovia, v. 50, n. 6, p. 397-407, 1992.

LAFONTAN, M. Differential recruitment and differential regulation by physiological amines of fat cell β -1, β -2 and β -3 adrenergic receptors expressed in native fat cells and in transfected cell lines. **Cellular Signalling**, New York, v. 6, n. 4, p. 363-392, May 1994.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 34, n. 7, p. 1057-1091, July 1993.

LEFEUVRE, R. A.; ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. **Neuropharmacology**, New York, v. 26, n. 8, p. 1217-1221, Aug. 1987.

LIGGETT, S. B.; RAYMOND, J. R. Pharmacology and molecular biology of adrenergic receptors. **Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 7, n. 2, p. 279-306, Apr. 1993.

LIU, C. Y.; BOYER, J. L.; MILLS, S. E. Acute effects of beta-adrenergic agonists on porcine adipocyte metabolism in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2930-2936, Nov. 1989.

LIU, C. Y. et al. Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 62-67, Jan. 1994.

MAIN, R. G.; DRITZ, S. S.; TOKACH, M. D. Effects of ractopamineHCl dose and treatment period on pig performance in a commercial finishing facility. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 17, n. 3, p. 134-139, 2009.

MALFITANO, C. et al. Hyperglycaemia protects the heart after myocardial infarction: aspects of programmed cell survival and cell death. **European Journal of Heart Failure**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 659-667, July 2010.

MARCHANT-FORDE, J. N. et al. The effects of ractopamine on the behavior and physiology of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 416-422, Feb. 2003.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 74, n. 4/5, p. 435-440, Nov./Dec. 2001.

MARULLO, S. et al. Variability in the regulation of β -adrenoceptor subtypes. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 23, n. 1, p. 126-129, 1995.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, Amsterdam, v. 886, n. 1/2, p. 172-189, Dec. 2000.

MCNEEL, R. L.; MERSMANN, H. J. β -adrenergic receptor subtype transcripts in porcine adipose tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 7, p. 1962-1971, July 1995.

MCNEEL, R. L.; MERSMANN, H. J. Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 611-621, Mar. 1999.

MERSMANN, H. J. Acute changes in blood flow in pigs infused with beta-adrenergic agonists. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2913-2920, Nov. 1989a.

_____. Evidence of classic b3-adrenergic receptors in porcine adipocytes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 5, p. 984-992, May 1996.

_____. Inhibition of porcine adipose tissue lipogenesis by β -adrenergic agonists. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 94C, n. 2, p. 619-623, 1989b.

_____. Overview of the effects of b-Adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 160-172, Jan. 1998.

_____. Species variation in mechanisms for modulation of growth by beta-adrenergic receptors. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, n. 6, p. 1777S-1782S, June 1995. Supplement.

MILLS, S. E. et al. Effects of ractopamine on adipose tissue metabolism and insulin binding in finishing hogs. Interaction with genotype and slaughter weight. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 7, n. 2, p. 251-264, Apr. 1990.

MILLS, S. E.; SPURLOCK, M. E.; SMITH, D. J. β -Adrenergic receptor subtypes that mediate ractopamine stimulation of lipolysis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 3, p. 662-668, Mar. 2003.

MIMBS, K. J. et al. Effects of ractopamine on performance and composition of pigs phenotypically sorted into fat and lean groups. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1361-1369, June 2005.

MITCHELL, A. D.; SOLOMON, M. B.; STEELE, N. C. Influence of level of dietary protein or energy on effects of ractopamine in finishing swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 11, p. 4487-4495, Nov. 1991.

NOMURA, S. et al. Stress and β -adrenergic receptorbinding in the rat's brain. **Brain Research**, Amsterdam, v. 224, n. 1, p. 199-203, Nov. 1981.

O'CONNOR, R. M. et al. Acute and chronic hormone and metabolite changes in lambs fed the beta-agonist, cimaterol. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 8, n. 4, p. 537-548, Oct. 1991.

O'DONNELL, J. M. Behavioral consequences of activation of beta adrenergic receptors by clenbuterol: evidence for mediation by the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 21, n. 3, p. 491-497, Sept. 1988.

OSTROWSKI, J. et al. Mutagenesis of the β -adrenergic receptor: how structure elucidates function. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 32, p. 167-183, 1992.

PAGE, K. A. et al. β -Adrenergic receptor agonists increase apoptosis of adipose tissue in mice. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 26, n. 1, p. 23-31, Jan. 2004.

PAN, S. J. et al. Effects of clenbuterol on insulin resistance in conscious obese Zucker rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v. 280, n. 4, p. E554-E561, Apr. 2001.

PELLOW, S. et al. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 149-167, Aug. 1985.

PIETRI-ROUXEL, F. et al. Molecular cloning and pharmacological characterization of the bovine β 3- adrenergic receptor. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 230, n. 1, p. 350-358, May 1995.

PIETRI-ROUXEL, F.; STROSBERG, A. D. Pharmacological characteristics and species-related variations of β 3-adrenergic receptors. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v. 9, n. 3, p. 211-218, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Version 2.12.2. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com/>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

RAPIEJKO, P. J. et al. G-proteins of fat-cells: role in hormonal regulation of intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate. **Biochemical Journal**, London, v. 240, n. 1, p. 35-40, Nov. 1986.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JUNIOR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

REITER, S. S. et al. Lipid metabolism related gene-expression profiling in liver, skeletal muscle and adipose tissue in crossbred Duroc and Pietrain Pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 2, n. 3, p. 200-206, Sept. 2007.

RICART-JANÉ, D. et al. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. **Metabolism**, New York, v. 51, n. 7, p. 925-931, July 2002.

RICKE, E. A. et al. Effects of ractopamine HCl stereoisomers on growth, nitrogen retention, and carcass composition in rats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 701-707, Mar. 1999.

ROBERTS, S. J. et al. Characterization of β -adrenoceptor mediated smooth muscle relaxation and the detection of mRNA for β 1-, β 2- and β 3-adrenoceptors in rat ileum. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 127, n. 4, p. 949-961, June 1999.

ROCHA, V. M. **Efeito do esteroide anabólico nandrolona sobre o nível de ansiedade em ratos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2006.

ROCHA, V. M. et al. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. **Stress**, Washington, v. 10, n. 4, p. 326-331, Nov. 2007.

RODGERS, R. J. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 68, n. 1/2, p. 47-53, Dec. 1999.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Sympathetic and adrenocorticoid influences on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in the rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 79A, n. 4, p. 575-579, 1984.

SAINZ, R. D. et al. Effects of ractopamine in pig muscles: histology, calpains and β -adrenergic receptors. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 44, n. 7, p. 1441-1448, 1993.

SEE, M. T.; ARMSTRONG, T. A.; WELDON, W. C. Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 2474-2480, Aug. 2004.

SENSKY, P. L. et al. The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 380-387, Feb. 1996.

SERRATOSA, J. et al. Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 25, n. 2, p. 637-653, 2006.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235 p.

SMITH, D. J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 173-194, Jan. 1998.

SMITH, D. J.; PAULSON, G. D. Growth characteristics of rats receiving ractopamine hydrochloride and the metabolic disposition of ractopamine hydrochloride after oral or intraperitoneal administration. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 404-414, Feb. 1994.

SMITH, U.; KURODA, M.; SIMPSON, I. A. Counter regulation of insulin-stimulated glucose transport by catecholamines in the isolated rat adipose cell. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 259, n. 14, p. 8758-8763, 1984.

SPURLOCK, M. E. et al. The effect of ractopamine on b-adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 75-80, Jan. 1994.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**, version 6. 4th ed. Cary, 1996. v. 2, 400 p.

STROSBERG, A. D. Biotechnology of beta-adrenergic receptors. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 40, n. 8, p. 767-772, 1992.

_____. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v. 2, n. 8, p. 1198-1209, Aug. 1993.

SUTTON, A. L. et al. Potential impact of ractopamine on environmental stewardship. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 1, p. 239-240, 2001. Supplement.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 44, n. 2, p. 463-469, Feb. 1993.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Adenilil ciclase**. Lavras, 2011. Projeto TICS. Arquivo swf.

UTTARO, B. E. et al. Effect of ractopamine and sex on growth, carcass characteristics, processing yield, and meat quality characteristics of crossbred swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 9, p. 2439-2449, Sept. 1993.

YEH, Y. C. et al. Dexmedetomidine prevents alterations of intestinal microcirculation that are induced by surgical stress and pain in a novel rat model. **Anesthesia and Analgesia**, Baltimore, v. 115, n. 1, p. 46-53, Jan. 2012.

ZHANG, J. et al. Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol. **BioMed Central Genomics**, London, v. 8, p. 433-445, Nov. 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A		Página
TABELA 1A	Análise de variância de desempenho e características de carcaça de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.	84
TABELA 2A	Análise Variância de pesos relativos viscerais de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.	86
TABELA 3A	Análise de Variância de parâmetros sanguíneos de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.	87
TABELA 4A	Análise de Variância da quantificação da proteína GLUT-4 no tecido adiposo de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a estresse crônico.	89
TABELA 5A	Análise de <i>deviance</i> Parâmetros comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado pelos ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse.	89
TABELA 6A	Análise de <i>deviance</i> Parâmetros comportamentais de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse, no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	90

TABELA 1A Análise de variância de desempenho e características de carcaça de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Consumo (g/dia)					
Estress	2	10,077912	5,038956	2,385	0,1008
Diasrac	4	4,834272	1,208568	0,572	0,6840
Estress *Diasrac	8	22,978648	2,872331	1,359	0,2329
Erro	60	126,774560	2,112909		
Total corrigido	74	164,665392			
CV (%)		8,03			
Ganho de Peso (g/dia)					
Estress	2	4,189056	2,094528	6,632	0,0025
Diasrac	4	1,011075	0,252769	0,800	0,5297
Estress *Diasrac	8	1,275757	0,159470	0,505	0,8479
Erro	60	18,948520	0,315809		
Total corrigido	74	25,424408			
CV (%)		41,68			
Rendimento de carcaça (%)					
Estress	2	0,102525	0,051263	0,679	0,5109
Diasrac	4	0,284813	0,071203	0,943	0,4452
Estress *Diasrac	8	0,171757	0,021470	0,284	0,9686
Erro	60	4,528345	0,075472		
Total corrigido	74	5,087440			
CV (%)		3,34			
Concentração de Proteína Bruta (%)					
Estress	2	7,861795	3,930897	0,890	0,4159
Diasrac	4	20,848632	5,212158	1,181	0,3285
Estress *Diasrac	8	21,788552	2,723569	0,617	0,7602
Erro	60	264,889840	4,414831		
Total corrigido	74	315,388819			
CV (%)		3,34			

TABELA 1A, conclusão

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração de Extrato Etéreo (%)					
Estress	2	4,910419	2,455209	0,075	0,9282
Diasrac	4	139,281507	34,820377	1,058	0,3852
Estress *Diasrac	8	188,170661	23,521333	0,715	0,6776
Erro	60	1974,634480	32,910575		
Total corrigido	74	2306,997067			
CV (%)		28,29			
Peso Músculo Gatrocnêmio (%)					
Estress	2	0,024201	0,012100	1,702	0,1910
Diasrac	4	0,039559	0,009890	1,391	0,2479
Estress *Diasrac	8	0,057140	0,007143	1,005	0,4422
Erro	60	0,426572	0,007110		
Total corrigido	74	0,547471			
CV (%)		10,58			
Peso Músculo Bíceps femoral (%)					
Estress	2	0,089096	0,044548	1,417	0,2503
Diasrac	4	0,153045	0,038261	1,217	0,3129
Estress *Diasrac	8	0,075011	0,009376	0,298	0,9638
Erro	60	1,885720	0,031429		
Total corrigido	74	2,202872			
CV (%)		22,29			
Peso Músculo <i>Longissimus dorsi</i> (%)					
Estress	2	0,000914	0,000457	0,007	0,9931
Diasrac	4	0,079000	0,019750	0,299	0,8778
Estress *Diasrac	8	0,075014	0,009377	0,142	0,9968
Erro	60	3,969490	0,066158		
Total corrigido	74	4,124418			
CV (%)		21,67			

TABELA 2A Análise Variância de pesos relativos viscerais de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Peso Trato Gastrintestinal (%)					
Estress	2	3,636531	1,818265	4,139	0,0207
Diasrac	4	3,900219	0,975055	2,220	0,0775
Estress *Diasrac	8	2,320509	0,290064	0,660	0,7239
Erro	60	26,358640	0,439311		
Total corrigido	74	36,215899			
CV (%)		11,35			
Peso Fígado (%)					
Estress	2	0,268331	0,134165	4,122	0,0210
Diasrac	4	0,278699	0,069675	2,141	0,0868
Estress *Diasrac	8	0,462389	0,057799	1,776	0,0998
Erro	60	1,953000	0,032550		
Total corrigido	74	2,962419			
CV (%)		7,07			
Peso Baço (%)					
Estress	2	0,002264	0,001132	2,743	0,0724
Diasrac	4	0,000645	0,000161	0,391	0,8143
Estress *Diasrac	8	0,003083	0,000385	0,934	0,4958
Erro	60	0,024760	0,000413		
Total corrigido	74	0,030752			
CV (%)		10,74			
Peso relativo Coração (%)					
Estress	2	0,001267	0,000633	0,443	0,6444
Diasrac	4	0,004965	0,001241	0,868	0,4887
Estress *Diasrac	8	0,009427	0,001178	0,824	0,5850
Erro	60	0,085840	0,001431		
Total corrigido	74	0,101499			
CV (%)		11,58			

TABELA 2A, conclusão

		Peso Rins (%)			
Estress	2	0,016771	0,008385	1,305	0,2787
Diasrac	4	0,009160	0,002290	0,356	0,8386
Estress *Diasrac	8	0,055016	0,006877	1,070	0,3959
Erro	60	0,385520	0,006425		
Total corrigido	74	0,466467			
CV (%)		11,12			
		Peso Trato Reprodutor (%)			
Estress	2	0,175776	0,087888	0,590	0,5574
Diasrac	4	1,204365	0,301091	2,022	0,1027
Estress *Diasrac	8	1,511491	0,188936	1,269	0,2768
Erro	60	8,933560	0,148893		
Total corrigido	74	11,825192			
CV (%)		14,72			

Tabela 3A Análise de Variância de parâmetros sanguíneos de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Glicose (mg/dL)					
Estress	2	567,156728	283,578364	0,177	0,838
Diasrac	4	2400,907333	600,226833	0,374	0,826
Estress *Diasrac	8	1291,791099	161,473887	0,101	0,999
Erro	60	96307,664040	1605,12773		
Total corrigido	74	100567,51920			
CV (%)		31,61			
Triacilglicerol (mg/dL)					
Estress	2	33,572129	16,786065	1,807	0,172
Diasrac	4	59,289789	14,822447	1,596	0,187
Estress *Diasrac	8	60,426645	7,553331	0,813	0,593
Erro	60	557,217321	9,286955		
Total corrigido	74	710,505885			
CV (%)		38,81			

Tabela 3A, continuação

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Colesterol total (mg/dL)					
Estress	2	6411,006888	3205,50344	0,955	0,3904
Diasrac	4	2844,386893	711,096723	0,212	0,9308
Estress *Diasrac	8	5106,346819	638,293352	0,190	0,9914
Erro	60	201305,2382	3355,08730		
Total corrigido	74	215666,9788			
CV (%)		56,66			
HDL (mg/dL)					
Estress	2	365,835392	182,917696	2,610	0,0819
Diasrac	4	117,468085	29,367021	0,419	0,7943
Estress *Diasrac	8	511,799795	63,974974	0,913	0,5122
Erro	60	4204,895160	70,081586		
Total corrigido	74	5199,998432			
CV (%)		17,27			
VLDL + LDL (mg/dL)					
Estress	2	7,994189	3,997095	0,301	0,7415
Diasrac	4	8,544452	2,136113	0,161	0,9574
Estress *Diasrac	8	7,408925	0,926116	0,070	0,9998
Erro	60	797,911198	13,298520		
Total corrigido	74	821,858763			
CV (%)		55,42			
Insulina (ng/mL)					
Estress	2	0,065097	0,032548	1,362	0,2638
Diasrac	4	0,009646	0,002412	0,101	0,9817
Estress *Diasrac	8	0,344357	0,043045	1,802	0,0945
Erro	60	1,433394	0,023890		
Total corrigido	74	1,852493			
CV (%)		19,98			

Tabela 3A, conclusão

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Corticosterona (ng/mL)					
Estress	2	111486,9317	55743,46586	11,753	0,000
Diasrac	4	21078,60853	5269,652133	1,111	0,359
Estress *Diasrac	8	36587,59959	4573,449950	0,964	0,472
Erro	60	284569,2157	4742,820263		
Total corrigido	74	453722,3556			
CV (%)		22,67			

Tabela 4A Análise de Variância da quantificação da proteína GLUT-4 no tecido adiposo de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a estresse crônico

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Estress	1	0,484850	0,484850	6,977	0,0247
Diasrac	4	0,476125	0,119031	1,713	0,2232
Estress *Diasrac	4	1,689336	0,422334	6,077	0,0096
erro	10	0,694933	0,069493		
Total corrigido	19	3,345244			
CV (%)		16,88			

Tabela 5A Análise de *deviance* Parâmetros comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado pelos ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse

Fontes de Variação	GL	<i>Deviance</i>	Valor <i>p</i> *
Número de entradas no braço aberto			
Estresse (E)	2	5,24	0,0727
Dias de ractopamina (DR)	4	1,52	0,8238
E x DR	8	16,45	0,0364
Resíduo	60	75,34	

Tabela 5A, conclusão

Fontes de Variação	GL	<i>Deviance</i>	Valor <i>p</i> *
% tempo de permanência no braço aberto			
Estresse (E)	2	292,27	0,0754
Dias de ractopamina (DR)	4	147,31	0,2474
E x DR	8	667,90	0,0420
Resíduo	60		

Tabela 6A Análise de *deviance* Parâmetros comportamentais de ratos, recebendo rações com 5 ppm de ractopamina e submetidos a diferentes níveis de estresse, no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Fontes de Variação	GL	<i>Deviance</i>	Valor <i>p</i> *
Número de entradas no braço fechado			
Estresse (E)	2	13,99	0,0282
Dias de ractopamina (DR)	4	10,07	0,2591
E x DR	8	4,98	0,9604
Resíduo	60		
Número de vezes que alcançam o fim do braço aberto			
Estresse (E)	2	4,50	0,11
Dias de ractopamina (DR)	4	3,28	0,51
E x DR	8	8,01	0,43
Resíduo	60		
Número de vezes de permanência no centro			
Estresse (E)	2	0,15	0,9650
Dias de ractopamina (DR)	4	12,40	0,2089
E x DR	8	6,70	0,9281
Resíduo	60		