

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

FABIO SEIDEL DOS SANTOS

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE L-ARGININA E CREATINA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

GUARAPUAVA
2013

FABIO SEIDEL DOS SANTOS

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE L-ARGININA E CREATINA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti

Co-orientadora: Prof(a). Dr(a). Sabrina Grassioli

GUARAPUAVA
2013

Santos, Fabio Seidel dos
S237e Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado / Fabio Seidel dos Santos. -- Guarapuava, 2013
xvi, 128 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013

Orientador: Carlos Ricardo Maneck Malfatti
Co-orientadora: Sabrina Grassioli
Banca examinadora: Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva, Edmar Miyoshi

Bibliografia

1. Biologia evolutiva. 2. Estresse crônico - biologia evolutiva. 3. L-arginina. 4. Creatina. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 599.3233



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato FÁBIO SEIDEL DOS SANTOS.

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, às 14h, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste teve início a defesa da dissertação "Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.", do candidato FÁBIO SEIDEL DOS SANTOS, perante a Comissão Examinadora constituída pelos professores: Dr Carlos Ricardo Maneck Malfatti (Orientador Presidente), Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva (Membro Titular), Dr Edmar Miyoshi (Membro Titular) e Dr.ª Sabrina Grassioli (Membro Suplente). Posteriormente, o candidato foi arguido pela banca, tendo respondido com conhecimento aos quesitos formulados pelos examinadores. Encerrada a arguição, procedeu-se o julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato APROVADO. A atual aprovação outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva com validade de trinta dias. A Presidência ressalvou que a obtenção dos créditos de Dissertação está condicionada ao disposto: depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador(a), assim como o comprovante de envio de artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com *Qualis* igual ou superior a **B1** (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa. O não cumprimento desses prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Guarapuava, 26 de fevereiro de 2013.

Prof Dr Carlos Ricardo Maneck Malfatti

Prof Dr Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Prof Dr Edmar Miyoshi

Dedico este trabalho aos meus pais,
Benedito e Roseli.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e motivação para correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus pais Benedito e Roseli e meu irmão Flávio pelo amor incondicional e constante incentivo ao aperfeiçoamento profissional. Pai e mãe, grande parte deste título pertence a vocês!

Aos meus familiares Rogério Seidel (tiozão), Cacilda, Marquinhos e Rogério Seidel Junior pelo carinho e auxílio durante as várias etapas deste curso.

Aos primos Vilson (Durango) e Rosângela (Polaca) e tia Zeni pelo carinho e por cederem gentilmente um espaço em suas residências para nossa hospedagem durante a realização das disciplinas.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Francisco (tico) pelos mais de 16 anos de amizade, incentivo, orientações antes e durante a realização do mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, pela amizade, confiança, orientações e oportunidade de executar este trabalho.

À minha coorientadora Prof.(a). Dr.(a). Sabrina Grassioli pela amizade e orientações.

Ao meu amigo Msc. Luiz Augusto da Silva por todo auxílio prestado durante todas as etapas do mestrado.

Aos meus amigos alunos de iniciação científica José Augusto Pochapski e Alan Raczenski e ao saudoso amigo ex-mestrando João Luiz Lang Pavlak (*in memoriam*) pela importante contribuição durante a execução dos experimentos.

Às amigas Juliana e Sandra (Serviços Gerais – UNICENTRO *campus* de Irati-PR) pela incansável disposição em nos ajudar no Laboratório.

À amiga doutoranda Palloma Hocayen pelas orientações durante a construção desta dissertação.

Aos meus amigos (ex-colegas de trabalho e alunos) da Escola de Educação Especial – APAE de Rebouças-PR pela amizade, incentivo e compreensão durante as minhas ausências.

Às amigas mestrandas Stefani Fischer, Nayara Leite, Elisângela Montes e Claudia Cancian pelo auxílio com a histologia.

Ao Prof. Msc. Ivo Ilvan Kerppers pela amizade, orientações e gentileza em ceder um espaço em seu laboratório para realização de parte dos experimentos.

Aos professores Dr. Marcos Pileggi, Dr Rogério Mateus, Dr.(a) Maria Luiza Buschini, Dr. Marcelo Vicari, Dr.(a) Maria Albertina (Tina), Dr.(a) Viviane Vicari (Vivi), Dr. Rodrigo Matiello e Dr. Rafael Metri pelos conhecimentos passados durante a realização das disciplinas.

Aos professores Dr. Edmar Miyoshi e Dr. Weber Cláudio F. N. da Silva pelas orientações durante e após a realização das bancas (qualificação e defesa).

Às secretarias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Zoli de Oliveira (UEPG) e Merielle Camilo (UNICENTRO), que sempre estão dispostas a nos ajudar com orientações, declarações e outros documentos.

À equipe da Farmácia de Manipulação Flora Vita de Rebouças-PR, especialmente as amigas Deise Bataglin e Jucinéia Marszalkovski, pelo auxílio na preparação das soluções.

À Prof(a) Isolde Xisto Perussolo pela revisão desta dissertação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

REACH

“Some dreams live on in time forever
Those dreams, you want with all your heart
And I'll do whatever it takes
Follow through with the promise I made
Put it all on the line
What I hoped for at last would be mine
If I could reach higher
Just for one moment touch the sky
From that one moment in my life
I'm gonna be stronger
Know that I've tried my very best
I'd put my spirit to the test
If I could reach higher
Some days are meant to be remembered
Those days we rise above the stars
So I'll go the distance this time
Seeing more the higher I climb
That the more I believe
All the more that this dream will be mine...”

Gloria Estefan & Diane Warren

“Alguns sonhos vivem no tempo para sempre
Sonhos que você deseja de todo coração
Eu farei o que for preciso,
Seguindo com a promessa que fiz
Coloquei tudo em ordem
Esperando que ele finalmente fosse meu
Se eu puder alcançar mais alto...
E por um instante tocar o céu
Neste momento da minha vida
Eu serei forte
Sei que fiz o meu melhor
Que coloquei meu espírito à prova
Se eu puder alcançar mais alto...
Alguns dias existem para serem lembrados
Aqueles dias em que nos elevamos acima das estrelas
Então irei quão longe for preciso
Vendo melhor à medida que subo
E quanto mais eu acreditar
Mais este sonho será meu...”

RESUMO

Esta pesquisa buscou investigar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado. Foram utilizados 35 ratos *Wistar*, machos, com aproximadamente 120 dias no início dos experimentos. Os animais foram divididos igualmente e aleatoriamente em cinco grupos: controle (Ct); estresse crônico (Ec); estresse crônico + L-arginina (Ec/La); estresse crônico + creatina (Ec/Cr) e estresse crônico + L-arginina e creatina (Ec/La+Cr). Os animais foram expostos ao estresse por um período de 40 dias, e diariamente e aleatoriamente escolheu-se um dos seguintes estressores: ambiente congestionado, exposição ao frio, imobilização, inclinação da caixa-moradia, luz intermitente, privação de alimento e ruído. Um dia após a última sessão de estresse, os animais foram submetidos às seguintes tarefas comportamentais: labirinto em cruz elevado, campo aberto, tarefa de comportamento alimentar e labirinto aquático de Morris. No dia posterior à última sessão de teste comportamental, os animais foram sacrificados mediante decapitação, o sangue troncular foi coletado para análise bioquímica (glicose, colesterol, triglicerídeos e corticosterona) e o coração, fígado, tecido adiposo (gorduras mesentérica, retroperitoneal e periepídimal), rim e glândula adrenal esquerda foram pesados. Os resultados mostraram que os animais do grupo Ec, mesmo consumindo maior quantidade de ração e água, tiveram menor ganho de peso corporal e apresentaram outros marcadores biológicos importantes do estresse crônico (por ex. menor volume hepático e glicemia elevada), mostrando também ansiedade no labirinto em cruz elevado e prejuízo locomotor na tarefa de campo aberto. Nenhum tratamento foi capaz de reduzir os efeitos do estresse no consumo de ração/água e glicemia, porém todos minimizaram o prejuízo deste na atividade locomotora e aumentaram o consumo de alimentos palatáveis (Froot Loops[®]). O tratamento com L-arginina provocou hipertrofia cardíaca. O tratamento com creatina diminuiu o peso relativo da glândula adrenal esquerda, preveniu a perda de peso corporal e hepático e promoveu um desempenho superior em memória espacial de trabalho. A coadministração de L-arginina e creatina proporcionou uma redução significativa no peso relativo do tecido adiposo e da glândula adrenal esquerda, bloqueou os efeitos hipertróficos cardíacos da L-arginina, reduziu a ansiedade no labirinto em cruz elevado e habilitou a ocorrência do aprendizado espacial em um protocolo de treinamento que não promoveu aprendizagem nos animais do grupo Ct. Concluindo, este estudo mostrou que a coadministração de L-arginina e creatina proporciona melhora em todos os parâmetros comportamentais avaliados, demonstrando superioridade em relação à administração isolada destas substâncias.

Palavras-chave: Estresse crônico; L-arginina; Creatina.

ABSTRACT

This research aimed to investigate the effects of administration of L-arginine and creatine on behavioral, biochemical, nutritional and anatomical parameters in rats submitted to a model of chronic variable stress. The study included 35 male *Wistar* rats, having approximately 120 days at the beginning of the experiments. The animals were divided equally and randomly into five groups: control (Ct), chronic stress (Ec); chronic stress + L-arginine (Ec/La); chronic stress + creatine (Ec/Cr) and chronic stress + L-arginine + creatine (Ec/La+Cr). The animals were exposed to stress for a period of 40 days and daily and randomly one of the following stressors were applied: crowded environment, exposure to cold, restraint, inclination of home cage, flashing light, food deprivation and noise. One day after the last stress session, the animals were subjected to the following behavioral tasks: elevated plus maze, open field task, measurement of palatable food intake and the Morris water maze test. The day after the last behavioral test session, the animals were sacrificed by decapitation, trunk blood was collected for biochemical analysis (glucose, cholesterol, triglycerides and corticosterone) and the heart, liver, adipose tissue (mesenteric, retroperitoneal and periepididymal fat), left kidney and adrenal gland were weighed. The results showed that the animals in group Ec, while consuming larger amounts of food and water, had lower body weight gain and showed other important biological markers of chronic stress (eg. lower liver weight and high blood glucose), also showing anxiety in the elevated plus maze and locomotor impairment in open field task. No treatment was able to reduce the effects of stress on feed/water intake and glucose, but all minimized the damage in the locomotor activity and increased consumption of palatable food (Froot Loops[®]). Treatment with L-arginine provoked cardiac hypertrophy. Creatine alone decreased the relative weight of the left adrenal gland, prevented body and liver loss weight and promoted a superior performance on spatial working memory. Coadministration of L-arginine and creatine provided a significant reduction in the relative weight of the adipose tissue and adrenal gland, blocked the hypertrophic cardiac effects of L-arginine, reduced anxiety in the elevated plus maze and has enable the occurrence of spatial learning in a training protocol that did not promote learning in group Ct. In conclusion, this study showed that coadministration of L-arginine and creatine provides improvement in all behavioral parameters evaluated, demonstrating superiority over the separate administration of these substances.

Keywords: Chronic stress, L-arginine, Creatine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – O eixo HPA e o SNA simpático e parassimpático envolvidos com a resposta do estresse.....	21
Figura 2 – Circuitos básicos do hipocampo.....	24
Quadro 1 – Tipos e características das memórias.....	26
Figura 3 – Destinos metabólicos da L-arginina nos mamíferos.....	34
Figura 4 – Síntese de NO catalisada pela NOS.....	35
Figura 5 – Mecanismos moleculares envolvidos na LTP. Imagens A e B: <i>fase precoce</i> da LTP. Imagens C e D: <i>fase tardia</i> da LTP.....	36
Figura 6 – Etapas do metabolismo da creatina.....	40
Figura 7 – Reações químicas catalisadas pela creatina quinase.....	41
Figura 8 – Caixa térmica ventilada.....	53
Figura 9 – Estresse por imobilização.....	53
Quadro 2 – Calendário geral, natureza e duração dos estressores aplicados.....	54
Figura 10 – Labirinto em cruz elevado.....	55
Figura 11 – Campo aberto.....	56
Figura 12 – Labirinto Aquático de Morris: Divisão em quadrantes e pontos cardeais.....	57
Figura 13 – Labirinto Aquático de Morris.....	58
Quadro 3 – Posições de largada dos animais nos dias de aquisição da memória de referência.....	58
Quadro 4 – Localização da plataforma e posições de largada dos animais nos dias de teste da memória de trabalho.....	59
Figura 14 – Fórmula para o cálculo do índice de Lee.....	60
Quadro 5 – Esquema geral das atividades desenvolvidas.....	61
Capítulo I – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.	
Figura 1 – Fórmula para o cálculo do índice de Lee.....	69

Gráfico 1 – Ganho de peso semanal durante o período de estresse.....	71
Gráfico 2 – Número de cruzamentos entre os quadrantes.....	75
Gráfico 3 – Número de entradas nos BAs (A) e nos BFs (B).....	75
Gráfico 4 – Tempo transcorrido nos BAs (A) e nos BFs (B).....	76
Gráfico 5 – Porcentagem de tempo transcorrido nos BAs (A) e porcentagem de entradas nos BAs (B).....	76
Gráfico 6 – Consumo de Froot Loops [®] durante as sessões de treinamento.....	77
Gráfico 7 – Latência para iniciar o consumo de Froot Loops [®] durante as sessões de treinamento.....	77
Gráfico 8 – (A) Número de Froot Loops [®] consumido (B) latência para iniciar o consumo (sessão de teste).....	78
Capítulo II: Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.	
Quadro 1 – Posições de largada dos animais nos dias de aquisição da memória de referência.....	94
Quadro 2 – Localização da plataforma e posições de largada dos animais nos dias de teste da memória trabalho.....	95
Gráfico 1 – (A) Peso relativo da glândula adrenal esquerda e (B) níveis plasmáticos de corticosterona.....	96
Gráfico 2 – Desempenho dos grupos na fase de aquisição da memória.....	97
Gráfico 3 – Fase de retenção da memória: (A) Latência para encontrar a plataforma e (B) % de tempo no quadrante alvo (Q.A.).....	98
Gráfico 4 – Latência para encontrar a plataforma no teste de memória de trabalho.....	99

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

Tabela 1 – Índice de Lee (Lee) e peso relativo do tecido adiposo (PTA).....72

Tabela 2 – Consumo semanal de ração durante o período de estresse (g/100g).....72

Tabela 3 – Ingestão semanal de água durante o período de estresse (ml/100g).....73

Tabela 4 – Peso relativo do fígado e rim esquerdo (g/100g).....74

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos: GLI (glicose), COL (colesterol total) e TRI (triglicerídeos).....74

Capítulo II – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

Tabela 1 – Peso relativo do coração (g/100g) e índice de hipertrofia cardíaca (IHC).....97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
CaMKII – Proteínas cinases dependentes de Ca^{++} /calmodulina II
AGAT – arginina: glicina amidino-transferase
AVP – Arginina-vasopressina
ATP – Trifosfato de adenosina
ADP – Difosfato de adenosina
CA – Campo aberto
CK – Creatina quinase
CMC – Carboximetilcelulose
Cr – Creatina
CRH – Hormônio liberador de corticotropina
Ct – Grupo controle total
DA – Doença de Alzheimer
DH – Doença de Huntington
DP - Doença de Parkinson
Ec/Cr – Grupo estresse crônico + creatina
Ec/La – Grupo estresse crônico + L-arginina
Ec/La+Cr – Grupo estresse crônico + L -arginina + creatina
ECM – Estresse crônico moderado
ECMI – Estresse crônico moderado imprevisível
ECV – Estresse crônico variado
ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica
EVA – Etileno acetato de vinila
GAA – Guanidinoacetato
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GD – Giro dentado
GAMT - S-adenosilmetionina: guanidinoacetato-N-metiltransferase
GCs – Glicocorticóides
GR – Receptores de glicocorticóides
LCE – Labirinto em cruz elevado
LAM – Labirinto aquático de Morris
LC/NA – Sistema *locus coeruleus*/noradrenalina
L-NAME – N^ω-nitro-L-arginina metil éster
HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
LTP – Potenciação de longa duração
MR – Receptores de mineralocorticóides
NMDA – Receptores N-metil-D-aspartato
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS – Óxido nítrico induzível
nNOS – Óxido nítrico neuronal
mtNOS - Óxido nítrico sintase mitocondrial
PCr – Fosfocreatina
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo
SNA – Sistema Nervoso Autônomo
SNC – Sistema Nervoso Central
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ESTRESSE.....	17
1.1.1 Considerações gerais.....	17
1.1.2 Mecanismos neurobiológicos da resposta de estresse.....	19
1.1.3 Estresse crônico e o sistema nervoso central (SNC).....	23
1.1.4 Estresse crônico e alterações neurocomportamentais.....	25
1.1.5 Paradigma do estresse crônico variado.....	30
1.2 - L-ARGININA.....	31
1.2.1 Descrição geral e síntese.....	31
1.2.2 L-arginina: destinos metabólicos.....	32
1.2.3 Óxido nítrico.....	34
1.3 CREATINA.....	38
1.3.1 Descrição geral.....	38
1.3.2 Síntese de creatina.....	39
1.3.3 Transporte e metabolismo da creatina.....	40
1.3.4 Creatina e doenças neurológicas.....	42
1.3.5 Creatina e doenças psiquiátricas.....	45
1.3.6 Creatina e funções cognitivas.....	46
1.3.7 Relações entre creatina e estresse psicológico.....	47
2. OBJETIVOS	49
2.1 OBJETIVO GERAL.....	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	50
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	50
3.3 MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO.....	52
3.4 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	54
3.4.1 Labirinto em cruz elevado.....	55
3.4.2 Campo aberto.....	55
3.4.3 Tarefa de comportamento alimentar.....	56
3.4.4 Labirinto aquático de Morris.....	57
3.5 CONSUMO DE RAÇÃO, INGESTÃO DE ÁGUA E PESO CORPORAL.....	59

3.6 PARÂMETROS ANATÔMICOS E BIOQUÍMICOS.....	60
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
4. RESULTADOS.....	62
4.1 Capítulo I – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado....	63
4.2 Capítulo II – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.....	88
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE

1.1.1 Considerações gerais

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que o estresse psicológico afeta aproximadamente 90% da população mundial, sendo considerado uma epidemia global (BAUER, 2002). No início dos anos 90, a Organização das Nações Unidas (ONU) classificou o estresse como a “doença do século 20” (MASCI, 2001).

O estresse é um assunto que desperta interesse da comunidade científica, sendo um objeto de estudo em pesquisas tanto nacionais quanto internacionais que visam compreender melhor o conceito e suas implicações para a qualidade de vida dos indivíduos. Estima-se que pelo menos 50% das pessoas doentes estejam sofrendo de problemas relacionados ao estresse (LIPP; MALAGRIS, 2001).

Interessantemente, o estresse sequer pode ser considerado como uma doença em si, mas um mecanismo de adaptação e proteção do organismo contra agentes internos e externos, denominados estressores (BAUER, 2002).

A resposta de estresse, nos mamíferos, integra componentes fisiológicos e psicológicos frente a adversidades reais ou percebidas como tais (HERMAN et al., 2012). É considerado uma “reação do organismo” provocada por alterações psicofisiológicas que aparecem quando uma pessoa se confronta com uma situação que, de um modo ou de outro, a irrite, amedronte, excite ou confunda, ou mesmo que a faça imensamente feliz (LIPP; MALAGRIS, 2001).

É um grande engano pensar que o estresse é uma reação presente apenas no homem e/ou na sociedade moderna. A resposta de estresse tem sido observada na escala filogenética desde os invertebrados até os vertebrados mamíferos, porém a maioria dos estudos concentra-se em mamíferos (FRANCI, 2005). O sistema biológico responsável pela reação de estresse tem sido altamente conservado durante o processo evolutivo e aperfeiçoado pela seleção natural, estando crucialmente envolvido em uma ampla gama de funções adaptativas nos seres humanos e animais (GIUDICE; ELLIS; SHIRTCLIFF, 2011).

A espécie humana, ao longo do caminho evolutivo, foi exposta a diversos

estressores ambientais que exerceram pressões seletivas sobre seu genoma, e a seleção natural favoreceu ancestrais que foram eficientes em combater a fome, desidratação e agentes prejudiciais, prevenindo assim o esforço excessivo e danos ao tecido. O estilo de vida da sociedade moderna mudou drasticamente do passado, e o ambiente moderno e a extensão da expectativa de vida parecem permitir a expressão de males associados às disfunções do sistema de estresse (CHROUSOS, 2009).

Historicamente, o termo “stress” é derivado da física e, neste campo de estudo, descreve uma força aplicada a um material capaz de alterar sua estrutura física (FRANCI, 2005). Nas ciências biológicas, o termo estresse é geralmente definido como uma condição que perturba a homeostase fisiológica e psicológica de um organismo (KIM; DIAMOND, 2002).

O conceito de homeostase foi criado pelo fisiologista americano Walter Cannon no início do século XX, e pode ser caracterizado como um estado de equilíbrio dinâmico constantemente desafiado por forças internas ou externas, denominadas estressores. A homeostase pode ser “ameaçada” ou “quebrada”, mas pode ser restabelecida por um complexo repertório de respostas comportamentais e fisiológicas adaptativas do organismo (CHROUSOS, 2009).

Apesar de ter criado o conceito de homeostase, Cannon nunca utilizou o termo “stress” em suas observações (PACÁK; PALKOVITS, 2001). No entanto, suas descobertas influenciaram fortemente o trabalho do médico endocrinologista Hans Selye (LIPP, 2003), que introduziu o termo e popularizou o conceito na literatura médica e científica do século XX.

O marco inicial da teoria de Selye sobre o estresse consistiu na publicação de um artigo na Revista Nature em 1936, intitulado "A syndrome produced by diverse nocuous agents" (PACÁK; PALKOVITS, 2001). Neste artigo, Selye descreveu uma tríade patológica composta por alargamento das glândulas adrenais, atrofia de estruturas linfáticas e úlceras gástricas em ratos expostos a vários agentes químicos e físicos nocivos (SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012). Estas alterações foram denominadas por Selye de Síndrome Geral da Adaptação (SGA), que é composta por três fases: (1) *fase de alarme*: surge quando o organismo elicia uma resposta de “luta ou fuga”, (2) *fase de resistência*: inicia-se quando o organismo permanece lutando contra o estressor e (3) *fase de exaustão*: aparece quando o organismo não consegue mais se adaptar ao estressor, podendo ocasionar alterações estruturais e,

em alguns casos, a morte do organismo (JACOBS, 2001).

Estressores são definidos como estímulos que desafiam ou provocam a quebra da homeostase. De maneira geral, podem ser divididos em quatro grupos: (1) *estressores físicos e/ou químicos* (como frio, calor, radiação intensa, barulho, vibração e substâncias tóxicas), (2) *estressores psicológicos* (respostas aprendidas em experiências adversas), (3) *estressores sociais* refletem interações conturbadas entre indivíduos (ex. inserir um animal em um território dominado por outro animal) e (4) *estressores que desafiam a homeostase metabólica e cardiovascular* (exercício físico, hipoglicemia, entre outros). Em termos de duração, os estressores podem ser divididos em agudos e crônicos (PACÁK; PALKOVITS, 2001; FRANCI, 2005;).

O sistema de estresse engloba um conjunto de elementos mobilizados para a adaptação do organismo a situações estressantes induzidas por diferentes estressores (FRANCI, 2005). A resposta de estresse é relativamente estereotipada e inata, que evoluiu para coordenar a homeostase e proteger os organismos durante estressores agudos. São respostas que acontecem ao nível do SNC e em vários órgãos e tecidos periféricos. No SNC, esta resposta inclui funções adaptativas visando aumentar a excitação, alerta, vigilância, cognição e inibir funções vegetativas, por exemplo, reprodução, alimentação e crescimento. Entre as funções periféricas, a resposta de estresse inclui o aumento da oxigenação e nutrição do cérebro, coração e músculos esqueléticos, aumento do metabolismo e inibição de algumas funções como crescimento e reprodução, respostas essenciais para a preparação do organismo para a “luta ou fuga” (CHROUSOS, 2009).

1.1.2 Mecanismos neurobiológicos da resposta de estresse

Os “componentes centrais” do sistema de estresse que iniciam e mantêm a resposta de estresse estão localizados no hipotálamo e no tronco encefálico. Estes incluem neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que liberam CRH (hormônio liberador de corticotropina) e AVP (arginina-vasopressina) e também o sistema *locus coeruleus/noradrenalina* (LC/NA) (TSIGOS; CHROUSOS, 2002; MASTORAKOS et al., 2005).

O sistema LC/NA inclui o *locus coeruleus* e outros grupos celulares noradrenérgicos da medula e ponte. A noradrenalina cerebral contribui para aumentar as respostas autonômicas e neuroendócrinas do estresse, participando

também da ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). Existem conexões neurais recíprocas entre os neurônios que secretam CRH e os neurônios do sistema LC/NA, sendo que o CRH e a noradrenalina estimulam a secreção um ao outro. A secreção de CRH é controlada por um ultracurto mecanismo de *feedback* negativo exercido pelo próprio CRH, o mesmo acontece com o sistema LC/NA cuja função também é regulada por *feedback* negativo tanto pelo CRH quanto pela noradrenalina. Existe outro mecanismo de regulação em paralelo de ambos os sistemas (CRH e LC/NA) por vias neurais estimulatórias (neurotransmissores como serotonina e acetilcolina) e inibitórias que incluem os glicocorticóides (GCs), GABA, corticotropina e vários peptídeos opióides, que inibem tanto os neurônios que secretam CRH quanto o sistema LC/NA (TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

Os principais efetores periféricos do sistema de estresse são representados pela eferência simpática do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e pelo eixo HPA, pelas quais o cérebro influencia todo o corpo durante exposição aos estímulos ameaçadores (TSIGOS; CHROUSOS, 2002; CHROUSOS, 2009). O cérebro ativa ainda um subconjunto de eferências parassimpáticas vagais e sacrais que mediam respostas viscerais ao estresse (TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

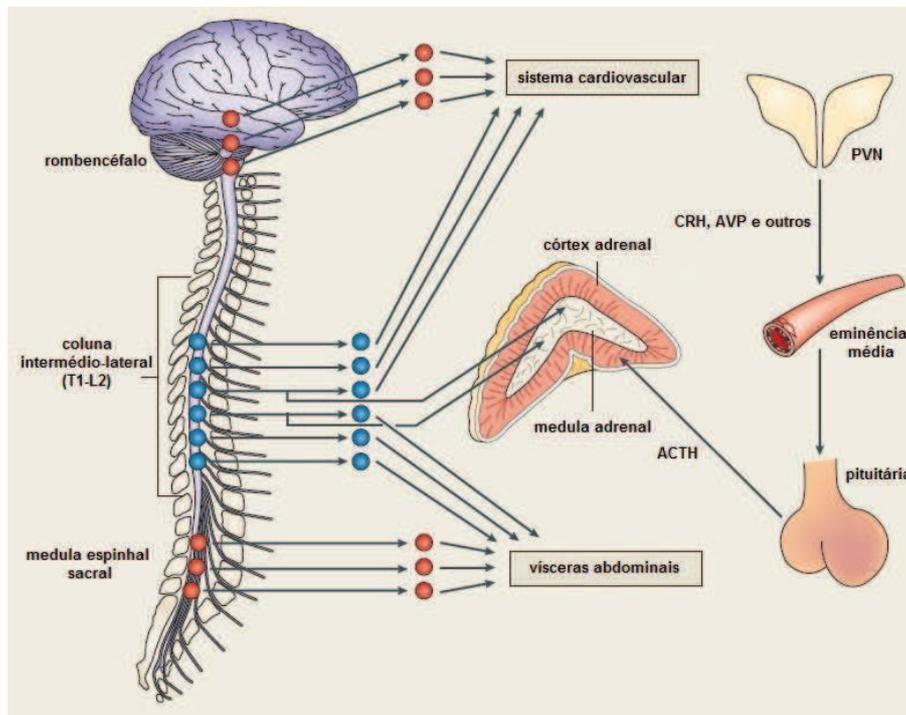
O SNA é submetido ao controle central do hipotálamo. Por meio de suas eferências simpática e parassimpática, o SNA fornece a resposta mais imediata à exposição ao estressor, provocando alterações rápidas nos estados fisiológicos por meio da inervação dos órgãos-alvo. A ativação simpática representa a resposta clássica de “luta ou fuga” descrita por Walter Cannon e seus colegas. Esta resposta caracteriza-se pelo aumento dos níveis de noradrenalina dos nervos simpáticos e adrenalina e noradrenalina das glândulas adrenais, que rapidamente (em segundos) aumentam a frequência cardíaca, pressão arterial, vasoconstrição periférica, vasodilatação muscular e mobilização de energia (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

As situações interpretadas como “estressantes” também estimulam o eixo HPA, e os neurônios do núcleo PVN do hipotálamo liberam o neuropeptídeo CRH (LUPIEN et al., 2007). A interação deste neuropeptídeo com seus receptores específicos na hipófise anterior resulta na síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no sangue. O ACTH por sua vez estimula o córtex das glândulas adrenais a liberar corticosterona (em roedores, pássaros) ou cortisol (em humanos, porcos) (KORTE, 2005). O hipotálamo também secreta o neuropeptídeo AVP, que age de maneira sinérgica com o CRH estimulando a secreção de ACTH.

Parece existir uma interação mútua entre CRH e AVP no nível do hipotálamo cada um estimulando a secreção do outro. Em situações estressantes a secreção de AVP e CRH aumenta consideravelmente, resultando no aumento de episódios de secreção de ACTH e GCs (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). O eixo HPA e as eferências simpática e parassimpática envolvidas na resposta do estresse podem ser visualizados na Figura 1.

Os GCs são assim denominados em função de sua habilidade em promover a conversão de proteínas em carboidratos prontamente disponíveis para o organismo (McEWEN, 2000). Estes hormônios têm seus picos plasmáticos aumentados em dezenas de minutos após o início do estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009), e quando secretados transitoriamente, auxiliam na sobrevivência do organismo, pois mobilizam energia, aumentam o tônus cardiovascular e suprimem atividades “desnecessárias”, como crescimento, reparação de tecidos, reprodução e imunidade (SAPOLSKY, 2000). A ação fisiológica principal dos GCs é a redistribuição de energia, aumentando a disponibilidade de combustíveis energéticos, a fim de promover a capacidade de sobrevivência frente a ameaças reais e percebidas (HERMAN et al., 2012).

Figura 1 – O eixo HPA e o SNA simpático e parassimpático envolvidos com a resposta do estresse.



Fonte: **Adaptado de** ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Ver Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun. 2009.

Os GCs circulantes agem nos tecidos-alvo por meio de mecanismos genômicos e não genômicos. Por mecanismos genômicos, estes hormônios regulam a expressão gênica nas células-alvo através da ativação de dois receptores: os receptores de glicocorticóides (GR) e receptores de mineralocorticoides (MR). Os mecanismos não-genômicos incluem respostas mais rápidas e envolvem ações diretamente na membrana da célula-alvo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; WALKER et al., 2012).

Os GCs também interagem com GRs presentes no próprio eixo HPA, por isso estes hormônios são responsáveis pela sua própria inibição por *feedback* negativo no hipotálamo (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; WALKER et al., 2012). Outras estruturas cerebrais também participam da regulação dos GCs por *feedback* negativo, como a amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo (CAMPEAU et al., 1998; SWAAB; BAO; LUCASSEN, 2005), sendo que este último apresenta elevada concentração de receptores de GCs.

A persistência e/ou intensidade exagerada dos estímulos estressores somada com a incapacidade do organismo em suprimir a resposta de estresse podem levar à hiperativação do eixo HPA e à consequente hipercortisolemia (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003).

A hiperatividade do eixo HPA e a consequente hipercortisolemia estão associados com a gênese e evolução de diversas patologias físicas e mentais. Estudos mostram que o excesso de GCs aparece em doenças cardiovasculares e autoimunes, infecções respiratórias superiores (COHEN et al., 2012), alcoolismo, depressão melancólica, anorexia nervosa, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico, transtorno do estresse pós-traumático, obesidade central e hipertireoidismo (TSIGOS; CHROUSOS, 2002; CHROUSOS, 2009). O excesso de GCs também pode aumentar os riscos de hipertensão arterial, úlceras, impotência sexual (SAPOLSKY, 2000) e induzir à resistência a insulina (ANDREWS; WALKER 1999).

As ciências biomédicas e comportamentais têm particular interesse em compreender os mecanismos do estresse em função da hipótese de que indivíduos expostos a situações estressantes em fases iniciais do desenvolvimento apresentam maiores taxas de mortalidade e morbidade por doenças crônicas do envelhecimento. Estudos mostram que crianças maltratadas pelos pais apresentam maior vulnerabilidade a doenças vasculares, autoimunes e mortalidade precoce (MILLER;

CHEN; PARKER, 2011). Há estudos que associam o estresse crônico com o aumento da morbidade e mortalidade por uma gama de condições, como câncer (CHIDA et al., 2008).

1.1.3 Estresse crônico e o sistema nervoso central (SNC)

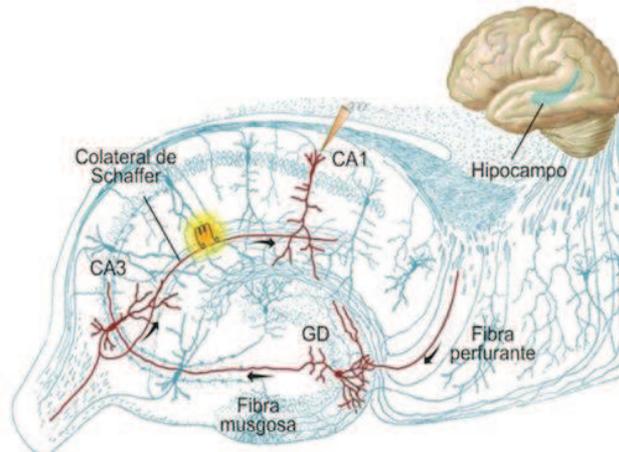
O SNC é um dos principais alvos dos hormônios do estresse. O excesso de GCs pode prejudicar estruturas cerebrais que regulam a sua própria secreção, como amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo (SWAAB; BAO; LUCASSEN, 2005). Contudo, estudos mostram que o hipocampo é a região mais vulnerável aos efeitos do excesso de GCs (SAPOLSKY, 2003), e os efeitos adversos destes hormônios na referida estrutura parecem ser mediados pela grande quantidade de GRs ocupados pelos GCs durante as situações de estresse. Estudos com ratos mostram que a estimulação excessiva dos GRs pela corticosterona pode prejudicar o metabolismo neuronal, sobrevivência celular, funções fisiológicas e morfologia neuronal (KIM; DIAMOND, 2002).

O estresse prolongado ou severo é altamente nocivo nas fases iniciais do desenvolvimento. O excesso de GCs nestas fases provoca um decréscimo na expressão de GRs hipocampais, comprometendo a função desta estrutura na regulação do eixo HPA por *feedback* negativo. Como resultado, animais submetidos ao estresse crônico nas fases iniciais do desenvolvimento mostram níveis basais elevados de ACTH e corticosterona, e intensas elevações de corticosterona podem ocasionar atraso no retorno deste a níveis basais com a suspensão do estressor (SANDSTROM; HART, 2005).

O estresse crônico¹ produz atrofia de neurônios piramidais da região CA3 hipocampal (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; VYAS; PILLAI; CHATTARJI, 2004) e atrofia dendrítica em neurônios piramidais da camada CA1 e do giro dentado (GD) de ratos ou daqueles tratados com altas doses de corticosterona (SOUZA et al., 2000). Os circuitos básicos do hipocampo podem ser visualizados na Figura 2.

¹Estresse crônico: exposição contínua ou repetida a um ou mais tipos de estressores ao longo de um período que varia de dias a meses (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Figura 2 – Circuitos básicos do hipocampo.



Fonte: **Adaptado de** LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

O estresse agudo ou crônico pode suprimir a neurogênese dos neurônios granulados do hipocampo (MCEWEN, 1999) e a produção de neurônios granulados no GD, que estão envolvidos nos processos de memória e aprendizagem (KIM, DIAMOND, 2002).

As altas concentrações de GCs podem ocasionar a morte de neurônios hipocâmpais da camada CA3, causando alterações nos processos de plasticidade sináptica² nesta estrutura (SAPOLSKY, 2000). Os processos de plasticidade sináptica hipocâmpal são importantes para a formação da memória e uma quantidade considerável de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o estresse crônico e seus hormônios alteram negativamente os mecanismos de potenciação de longa duração (LTP) (KIM; DIAMOND, 2002). Em situações de estresse agudo ou crônico, a LTP nas sinapses hipocâmpais é praticamente anulado, porém a intensidade das alterações varia conforme a região hipocâmpal analisada, bem como a magnitude do estresse (KUMAR, 2011).

Uma expressão completa dos efeitos dos hormônios do estresse na plasticidade sináptica hipocâmpal necessita da coativação da amígdala. Os sinais de saída ou *output* da amígdala são fundamentais para a modulação da plasticidade sináptica hipocâmpal e formação da memória em situações de estresse. Em manipulações experimentais em que os sinais da amígdala para o hipocampo estão

²O conceito plasticidade refere-se à capacidade do sistema nervoso de alterar a sua função ou a sua estrutura em resposta às influências ambientais que o atingem. A plasticidade sináptica é uma forma de plasticidade prevalente no cérebro adulto normal e está intimamente relacionada com o armazenamento de informações (LENT, 2008).

prejudicados, a plasticidade sináptica hipocampal não sofre influência do estresse, porém naquelas em que os sinais da amígdala para o hipocampo estão preservados, os efeitos nocivos do estresse na plasticidade sináptica hipocampal é mais pronunciado (KIM; DIAMOND, 2002).

O estresse crônico prejudica a atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATPases hipocampais, provocando déficits de memória espacial e sintomas depressivos em ratos (VASCONCELLOS et al., 2005; GAMARO et al, 2003b). Mais recentemente, Crema et al. (2010) descobriram que o estresse crônico também prejudica as enzimas Na^+ , K^+ - ATPases amigdalares promovendo sintomas de ansiedade nestes animais.

1.1.4 Estresse crônico e alterações neurocomportamentais

A aprendizagem e memória são funções bastante prejudicadas pelo estresse crônico. De forma geral, pode-se conceituar aprendizagem como um processo pelo qual os seres humanos e animais adquirem informações do ambiente (interno e externo) e memória como um processo pelo qual estas informações são codificadas, armazenadas e posteriormente recuperadas (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 1991).

De acordo com estas definições, pode-se classificar a memória em vários tipos e subtipos diferentes, os quais são operados por regiões cerebrais distintas. Algumas formas de memória estão prontamente disponíveis à consciência, correspondem a fatos e eventos, e em conjunto são chamadas de declarativas. Existem também formas de memória que não estão prontamente disponíveis à consciência, chamadas de memória de procedimentos. Este tipo de memória é importante para habilidades aprendidas previamente que se tornam automáticas, como andar de bicicleta, dirigir um carro, entre outras (SQUIRE; ZOLA, 1996; OKANO; HIRANO; BALABAN, 2000). Os tipos, subtipos e características das memórias podem ser visualizadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Tipos e características das memórias

Classificação das memórias quanto ao tempo de retenção			
Tempo de retenção		Características	
Ultrarrápida ou imediata		Dura frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial.	
Curta duração		Dura minutos ou horas, garante o sentido de continuidade do presente.	
Longa duração		Dura horas, dias ou anos, garante o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo.	
Classificação das memórias quanto a sua natureza			
Tipos	Subtipos	Características	Regiões cerebrais
Explícita ou declarativa (pode ser descrita por meio de palavras e outros símbolos)	Episódica	Tem uma referência temporal: memória de fatos sequenciados.	Lobo temporal medial Diencefalo
	Semântica	Envolve conceitos atemporais: memória cultural.	
Implícita ou não-declarativa (não precisa ser descrita por meio de palavras)	De representação perceptual	Representa imagens sem significado conhecido: memória pré-consciente.	Neocórtex
	De procedimentos	Hábitos, habilidades e regras.	Estriado Cerebelo
	Associativa	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma certa resposta (condicionamento operante).	Amígdala (respostas emocionais) Cerebelo (respostas musculares esqueléticas)
	Não associativa	Atenua uma resposta (habituação) ou aumenta-a (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.	Vias reflexas
Memória operacional ou de trabalho		Permite o raciocínio e o planejamento do comportamento.	Córtex pré-frontal (componente executivo) Córtex parieto-occipital

Fonte: **Adaptado de** LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

Nota: as informações sobre as regiões cerebrais foram capturadas de SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 24, p. 13.515-22, Nov. 1996.

A memória espacial, um subtipo de memória declarativa, é importante para a localização espacial (NAKAZAWA et al., 2004). Este tipo de memória permite a formação de um mapa cognitivo, uma representação mental da disposição espacial do ambiente, bem como dos itens presentes no mesmo (MANNIS; EICHENBAUM, 2009).

A representação espacial oriunda de mapas cognitivos parece superior em relação à representação espacial pela formação de rotas. O conhecimento obtido a partir da formação de rotas descreve uma sequência de passos que conduzem o indivíduo de um ponto de partida, através de pontos de referência, para um destino final. É um tipo de representação espacial inflexível, e mudanças em pontos ambientais ou desvios podem levar à desorientação. Em contrapartida, a representação espacial por meio de mapas cognitivos mostra-se mais flexível e não depende de marcos ou pontos ambientais para se navegar de um local para outro (MOSCOVITCH et al., 2005).

O hipocampo é classicamente destacado como a estrutura cerebral responsável pelo aprendizado e memória espacial em humanos e roedores, sendo importante para a formação de mapas cognitivos (OKANO; HIRANO; BALABAN, 2000; MANNS; EICHENBAUM, 2009; KUMARAN; MAGUIRE, 2005). Contudo, estudos mais recentes mostram que outras estruturas cerebrais também são igualmente importantes para o aprendizado e memória espacial, entre elas o estriado, que juntamente com o hipocampo desempenha um papel crítico no aprendizado espacial nas versões com pistas visuais e espaciais do labirinto aquático de Morris (MIYOSHI et al., 2012).

Os estudos com humanos e animais conduzidos nas últimas duas décadas mostram que o estresse e seus hormônios podem alterar a função e morfologia hipocampal, prejudicando formas de memória dependentes desta estrutura (KIM; DIAMOND, 2002). Contudo, existem estudos em que as alterações morfológicas no hipocampo são menos pronunciadas em métodos histológicos, por isso os testes comportamentais podem ser uma estratégia metodológica eficaz para avaliar o funcionamento desta estrutura (VASCONCELLOS et al., 2003).

O estresse crônico por imobilização prejudica a memória espacial no labirinto em Y (CONRAD et al., 1996), provocando retração dendrítica na camada CA3 hipocampal, mas sem causar alterações na navegação ou locomoção hipocampo-independente, por exemplo, agilidade (KLEEN et al., 2006). Este modelo de estresse também causa prejuízos na aquisição da memória espacial no labirinto radial de oito braços, condição acompanhada da atrofia dos dendritos neurônios hipocampais da camada CA3 (LUINE; VILLEGAS; McEWEN, 1994) e déficits de memória espacial de trabalho no labirinto aquático radial de oito braços (MIKA et al., 2012). O estresse crônico variado prejudica a memória espacial de referência e trabalho no labirinto

aquático de Morris (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005; TAGLIARI, et al., 2011).

Os problemas comportamentais resultantes de danos nas células hipocâmpais também são observados em humanos, por exemplo, alterações na memória explícita têm sido observadas em desordens neuropsiquiátricas como Síndrome de Cushing, Depressão e Estresse Pós-Traumático, patologias que têm em comum a hiperativação do eixo HPA e hipercortisolemia (SAPOLSKY, 2000). Inúmeros estudos de neuroimagem têm mostrado que humanos com estresse pós-traumático apresentam redução do volume hipocâmpal e dificuldades em tarefas dependentes desta estrutura (GOSWAMI et al., 2012). A administração de cortisol em níveis semelhantes aos liberados em situações de estresse prejudica a memória declarativa verbal, mas não afeta a memória não verbal de procedimento (UDDO et al., 1993).

A exposição aos hormônios do estresse desempenha um papel importante no desenvolvimento de transtornos depressivos, embora os mecanismos bioquímicos envolvidos nesta relação ainda sejam pouco conhecidos (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Em depressões agudas existe a hipersecreção de CRH, ACTH e cortisol, enquanto que em depressões crônicas, em virtude da sensibilidade melhorada das adrenais ao ACTH juntamente com o trabalho de *feedback* negativo exercido pelos GCs, o ACTH apresenta-se reduzido enquanto que o cortisol permanece elevado (PARKER; SCHATZBERG; LYONS, 2003).

A sinalização prejudicada dos GRs é fundamental na fisiopatologia dos transtornos depressivos (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004). Estudos têm mostrado que a função dos GRs aparece alterada na depressão maior, reduzindo o processo de *feedback* negativo exercido pelos GCs no eixo HPA. Alguns sintomas da depressão podem ser produzidos em roedores pela administração crônica de GCs, e pacientes com Síndrome de Cushing, que apresentam hipercortisolemia, também mostram características depressivas e atrofia hipocâmpal (NESTLER 2002; KRISHNAN; NESTLER, 2008).

Algumas evidências sustentam a participação da formação hipocâmpal no desenvolvimento da depressão: (1) drogas antidepressivas minimizam as alterações morfológicas no hipocampo promovidas pelos GCs, (2) os antidepressivos facilitam a neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo e atenuam as consequências comportamentais do estresse (3) o antagonismo do glutamato (aumentado durante o estresse) produz efeitos semelhantes, (4) o hipocampo parece estar mais

“hiperativo” em humanos resistentes a antidepressivos e animais geneticamente mais propensos à depressão e (5) o hipocampo juntamente com o complexo amigdalóide parecem ter um papel fundamental na consolidação e evocação de memórias aversivas, e a hiperatividade deste circuito pode facilitar o desenvolvimento de desordens afetivas (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003).

O contexto apresentado mostra que o estresse crônico pode produzir comportamentos depressivos em ratos, porém somente em alguns casos produz comportamentos ansiosos. Em um paradigma de estresse crônico imprevisível, Bondi et al. (2008) observaram sinais de ansiedade em ratos testados no labirinto em cruz elevado, evidenciada pela aversão aos braços abertos do aparelho. Matuszewich et al. (2007), ao contrário, não perceberam alterações importantes no comportamento de ratos submetidos ao estresse crônico variado e avaliados no mesmo equipamento. Esses resultados contraditórios podem ser atribuídos a fatores como diferenças no tipo de estressor, tempo entre aplicação dos estressores e avaliação da ansiedade, bem como questões referentes ao sexo dos animais (VENHEIM, 2010).

O estresse crônico influencia o comportamento alimentar de roedores, provocando aumento ou diminuição da preferência de alimentos doces, conforme o modelo de estresse utilizado. O estresse crônico por imobilização aumenta o consumo de alimentos doces, e esse efeito pode ser revertido pela administração de diazepam (ELY et al., 1997) midazolam (SILVEIRA et al., 2000) e cafeína (PETTENUZZO et al., 2008). Torres et al. (2002) verificaram os possíveis mecanismos bioquímicos subjacentes a esse comportamento e identificaram alterações serotoninérgicas e dopaminérgicas corticais, hipocampais, hipotalâmicas e amigdalares. O estresse crônico variado, ao contrário, parece promover a diminuição da preferência por alimentos doces, uma expressão da anedonia³. Este comportamento está bioquimicamente relacionado a alterações no sistema serotoninérgico, dopaminérgico (cortical, hipocampal e hipotalâmico), bem como a prejuízos na atividade das enzimas Na⁺, K⁺, ATPases hipocampais (GAMARO et al., 2003a, 2003b).

³Anedonia: incapacidade de sentir prazer em várias esferas da vida (DALGALARRONDO, 2000)

1.1.5 Paradigma do estresse crônico variado

O primeiro modelo de estresse crônico variado utilizado como modelo animal de depressão foi desenvolvido por Katz (1981). Originalmente este modelo apresentava alguns estressores considerados severos, como choque elétrico, exposição a altas temperaturas, nado forçado em baixas temperaturas, entre outros. Os animais eram expostos aos estressores de maneira imprevisível por um período de 21 dias, e os poucos que sobreviviam, apresentavam menor consumo de soluções açucaradas, decréscimo na atividade locomotora e altos níveis plasmáticos de corticosterona.

O modelo de estresse de Katz serviu de base para o desenvolvimento de outros modelos animais de estresse e depressão, especialmente o modelo de estresse crônico moderado (*chronic mild stress*) desenvolvido por Willner et al. (1987), uma versão mais “amena” do modelo desenvolvido por Katz.

O modelo de estresse crônico moderado (ECM) também leva em consideração a aplicação de estressores diferentes, pois a aplicação de somente um único estressor de maneira repetida fatalmente levaria à habituação. Neste modelo, ratos ou camundongos são expostos sequencialmente, por um período de semanas, a uma variedade de estressores considerados amenos (inclinação das caixas-moradas, períodos de privação de água e alimento, entre outros), e entre a primeira e terceira semana de estresse, exibem um decréscimo na sensibilidade a recompensas, geralmente acompanhada por uma redução no consumo de soluções açucaradas (WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992; WILLNER, 1997), que é considerado um estado de anedonia, um sintoma chave da depressão em humanos (SCHWEIZER; HENNIGER; SILLABER, 2009).

O modelo de estresse crônico variado utilizado neste trabalho é uma adaptação do modelo utilizado por Gamaro et al. (2003a, 2003b) e Vasconcellos et al. (2003, 2005), os quais também são uma adaptação de modelos pré-existentes de estresse e depressão, incluindo o ECM de Willner et al. (1987) e outros consagrados como Konarska; Stewart e McCarty (1990), Papp; Willner e Muscat (1991), entre outros.

Neste modelo de estresse crônico, os animais são expostos por um período de 40 dias a estressores de natureza variada (privação de água e alimento, nado forçado, imobilização, isolamento, ruído, luz intermitente, entre outros), um estressor

escolhido aleatoriamente a cada dia e aplicados em diferentes horários para minimizar a previsibilidade do animal (VASCONCELLOS et al., 2005). A partir deste modelo de estresse, pesquisadores observaram várias alterações bioquímicas e comportamentais em ratos, como diminuição da atividade das enzimas Na^+ , K^+ -ATPases na amígdala (CREMA et al., 2010) e no hipocampo (GAMARO et al., 2003b; VASCONCELLOS, et al., 2005), condições acompanhadas de comportamentos ansiosos (CREMA et al., 2010), déficits de memória espacial (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005) e diminuição do consumo de alimentos palatáveis (Froot Loops[®]) (GAMARO et al., 2003a, 2003b).

A diminuição no consumo de alimentos palatáveis a partir deste modelo de estresse também é acompanhada de alterações dopaminérgicas e serotoninérgicas em regiões cerebrais relacionadas com o comportamento alimentar, tais como o hipotálamo (GAMARO et al., 2003a).

1.2 L-ARGININA

1.2.1 Descrição geral e síntese

Houve uma rica história de estudos sobre a L-arginina e seu metabolismo nos últimos 100 anos (WU; MORRIS, 1998). A ocorrência deste aminoácido em proteínas de mamíferos foi descoberta por Hedin em 1895, porém sua existência como molécula natural já era bem conhecida desde 1886, quando foi isolada pela primeira vez em sementes de lúpulus (BÖGER; BODE-BÖGER, 2001).

Em 1897, Schulze e Winterstein estabeleceram sua estrutura pelo método de hidrólise alcalina, que levou a liberação de ornitina e ureia, e a síntese a partir de benzilornitina em 1910, por Sorensen. A descoberta do ciclo da ornitina (ciclo da uréia) por Krebs e Henseleit em 1932, levou à elucidação dos papéis proeminentes da L-arginina nas vias metabólicas e fisiológicas (WU; MORRIS, 1998).

A L-arginina ou ácido(L)-2-amino-5-guanidinovalérico é tradicionalmente classificado como um aminoácido semiessencial ou condicionalmente essencial (WIESINGER, 2000). A síntese endógena de L-arginina em adultos saudáveis é suficientemente grande, por isso ela não é considerada um aminoácido essencial na dieta destes. No entanto, a síntese endógena pode não satisfazer plenamente as necessidades de bebês, crianças em desenvolvimento ou mesmo adultos em

estresse catabólico ou com disfunções renais ou no intestino delgado, assim a L-arginina é um aminoácido semiessencial ou condicionalmente essencial (MORRIS JUNIOR, 2006).

O organismo obtém L-arginina através de fontes exógenas (proteínas da dieta), síntese endógena e quebra de proteínas corporais (MORRIS JUNIOR, 2006). Uma dieta típica ocidental contém em torno de 3 a 6g de L-arginina, sendo a maioria derivada das proteínas das plantas, como a soja (PADDON-JONES; BORSHEIM; WOLFE, 2004). Pode-se também encontrar L-arginina no chocolate, gérmen de trigo, granola, derivados do leite, castanhas, sementes, carnes e frutos do mar (NOVAES; BEAL, 2004). No entanto, aproximadamente 40% da L-arginina da dieta é catabolizada pelo intestino antes de entrar na circulação. Durante estado de jejum, aproximadamente 80% da L-arginina que atinge a circulação é derivada do turnover de proteína, sendo o restante originário da síntese endógena (MORRIS JUNIOR, 2006).

Uma das principais funções da L-arginina é sua participação na síntese de proteínas. Contudo, este aminoácido também participa da detoxificação da amônia formada no ciclo da ureia, pode ser convertida em glicose (por isso é classificada em aminoácido gliconeogênico), pode ser catabolizada para produzir energia e está envolvida em diversas vias metabólicas que produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos, como óxido nítrico (NO), creatina, agmatina, glutamato, poliaminas, ornitina e citrulina (CAMPBELL; BOUNTY; ROBERTS, 2004). A L-arginina também apresenta função secretagoga, induzindo a liberação de somatotrofina e prolactina pela hipófise, a liberação pancreática de insulina, estimulando a produção de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e a liberação de hormônios anti-insulinêmicos como glucagon, somatostatina e catecolaminas (SUCHNER; HEYLAND; PETER, 2002).

1.2.2 L-arginina: destinos metabólicos

A L-arginina pode agir como substrato por quatro conjuntos de enzimas: arginina descarboxilase, arginina: glicina amidinotransferase, arginases e óxido nítrico sintases (NOS). Com exceção da arginina descarboxilase, todas as enzimas atuam no grupo guanidino da L-arginina (MORRIS JUNIOR, 2006).

A enzima arginina-descarboxilase realiza a descarboxilação da L-arginina formando agmatina e CO₂. A agmatina é hidrolisada pela enzima agmatinase a putrescina (REGUNATHAN, 2006).

As arginases apresentam duas isoformas: tipo I (citossólica) e tipo II (mitocondrial). Essas enzimas catalisam a desintegração da L-arginina em L-ornitina e ureia, por isso diz-se que a L-arginina participa como um intermediário no ciclo da ureia.

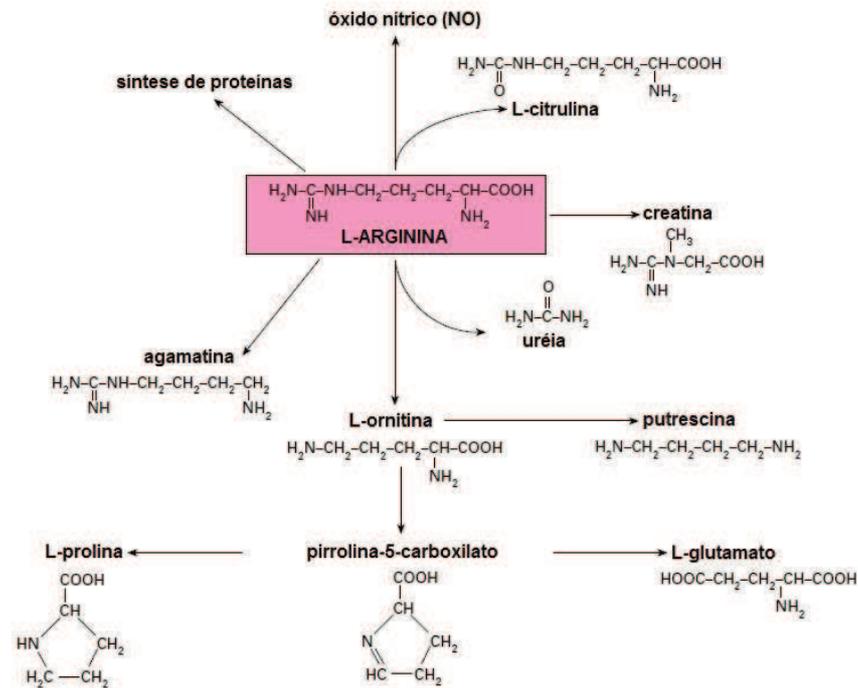
A L-ornitina é uma molécula precursora da síntese de poliaminas, moléculas essenciais para a proliferação e diferenciação celular (BÖGER; BODE-BÖRGER, 2001). As poliaminas também apresentam relação com a formação da memória em função da sua capacidade de interagir com sítios específicos em receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Pesquisadores descobriram que a facilitação do aprendizado e memória pela espermidina envolve a produção de óxido nítrico (NO) (GUERRA et al., 2006).

A enzima arginina: glicina amidinotransferase (AGAT) catalisa a primeira reação no processo de síntese de creatina, que será discutida com maiores detalhes adiante (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000; DERAIVE et al., 2004).

A síntese de L-arginina pode acontecer no fígado via ciclo da ureia, porém nenhuma produção biodisponível de L-arginina acontece por essa via, em função da elevada atividade de arginases que rapidamente hidrolisam a L-arginina em ureia e ornitina (WU et al., 2009). Conseqüentemente, a maioria da L-arginina em humanos e na maioria dos mamíferos (incluindo porcos, ovelhas e ratos) provem de sua síntese principalmente via eixo intestinal-renal. As células do intestino delgado produzem citrulina principalmente a partir da glutamina e glutamato, e a citrulina circulante é extraída da circulação pelos túbulos renais proximais e convertida em L-arginina, em uma reação mediada pelas enzimas argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liase (WU; MORRIS, 1998). Em neonatos, a maioria da citrulina sintetizada nos enterócitos é convertida localmente em L-arginina (WU et al., 2009).

É provável que o destino metabólico mais estudado da L-arginina seja sua conversão em NO, em que a L-arginina serve como substrato para uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (BÖGER, 2007). Os principais destinos metabólicos da L-arginina podem ser visualizados na Figura 3.

Figura 3 – Destinos metabólicos da L-arginina nos mamíferos.



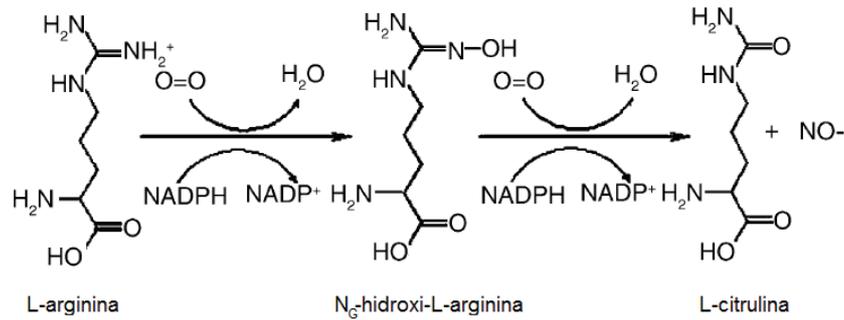
Fonte: **Adaptado de** WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, p. 1-17, Nov. 1998.

1.2.3 Óxido nítrico

O NO é uma molécula gasosa incolor, inorgânica, encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, sendo altamente reativa em função de um elétron desemparelhado na camada de valência (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). É uma molécula com meia vida curta, sendo rapidamente oxidado a nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) e peroxinitrito (ONOO^-) (BECKMAN, 1996).

No processo de síntese de NO, a L-arginina na presença de nicotinamida-adeninad nucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e oxigênio (O_2) é oxidada a uma molécula intermediária, a N_G -hidroxi-L-arginina, que na presença de NADPH e O_2 , é reoxidada para L-citrulina, formando também NO. A síntese de NO pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4 – Síntese de NO catalisada pela NOS.



Fonte: **Adaptado de** GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-152, Jun. 2005.

Existem três isoformas reconhecidas da NOS: NOS neuronal (nNOS ou NOS I), NOS induzível (iNOS ou NOS II), NOS endotelial (eNOS ou NOS III) (LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010). As isoformas nNOS são expressas principalmente em neurônios maduros e em desenvolvimento, as eNOS em células endoteliais e as iNOS em macrófagos e outros tecidos em resposta a mediadores inflamatórios (GUIX et al., 2005; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010). A presença de uma quarta isoforma, a NOS mitocondrial (mtNOS), ainda está em discussão entre os cientistas (LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010).

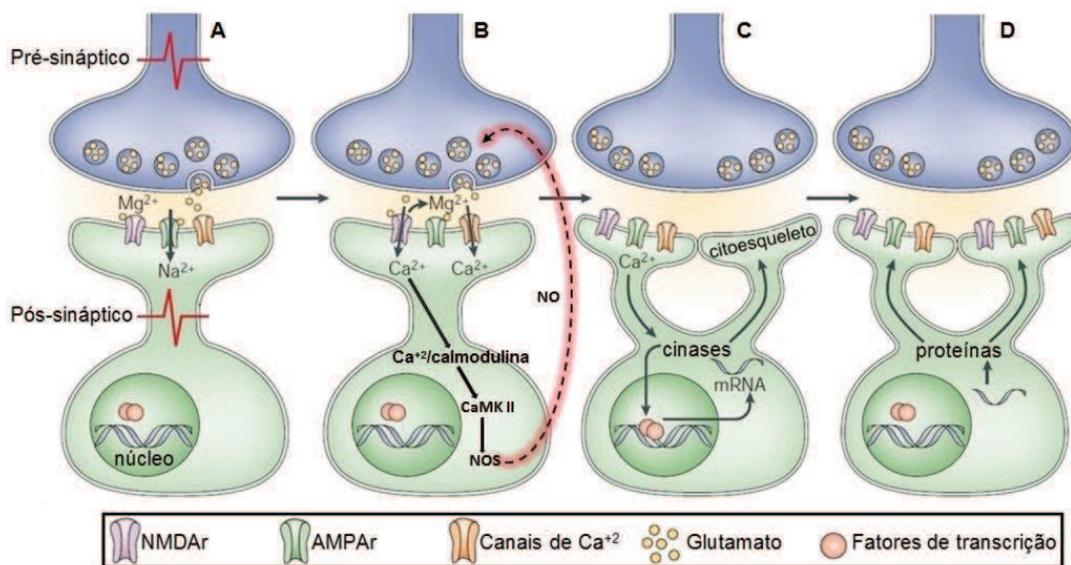
O papel do NO no SNC é conhecido mesmo antes da sua natureza química ser revelada. Esta molécula tem sido associada com a percepção da dor, controle do sono, apetite, termorregulação, desenvolvimento neural e plasticidade sináptica (GUIX et al., 2005).

Os neurônios sintetizam NO em resposta a ativação de receptores NMDA pelo aminoácido excitatório glutamato (PAUL; EKAMBARAM, 2011). Mais especificamente, quando o glutamato é liberado do terminal pré-sináptico, difunde através da fenda sináptica e interage com receptores do tipo AMPA e NMDA presentes na membrana das espinhas dendríticas do neurônio pós-sináptico. Isto promove inicialmente a abertura de canais AMPA, promovendo o deslocamento transmembrana de íons Na⁺ e K⁺ e a consequente despolarização da membrana. As baixas concentrações de glutamato não despolarizam suficientemente a membrana pós-sináptica para permitir a liberação dos íons de Mg⁺² que bloqueiam os canais dos receptores NMDA, que permanecem inativos. Entretanto, altas concentrações de glutamato conduzem a despolarização a um limiar significativo, e os receptores NMDA mudam sua conformação e liberam os íons Mg⁺², aumentando a troca de íons

Na^+ e K^+ e permitindo a entrada de grande quantidade de íons de Ca^{+2} no meio intracelular do neurônio pós-sináptico (COOKE; BLISS, 2006).

Existem mecanismos que prolongam a liberação de glutamato, mantendo esse fenômeno por horas, muitas vezes dias. Os íons de Ca^{+2} ao entrarem no neurônio pós-sináptico ativam mecanismos de sinalização cálcio-sensíveis, como as vias dependentes de adenosina cíclica monofosfato (cAMP) e formam os complexos Ca^{+2} /calmodulina, e estes últimos podem ativar proteínas cinases dependentes de Ca^{+2} /calmodulina II (CaMK II), que ativam as enzimas NOS (COOKE; BLISS, 2006). Estas, por sua vez, catalisam a reação de síntese de NO descrita anteriormente (Figura 4). O NO é liberado do neurônio pós-sináptico e age como um mensageiro retrógrado, aumentando a liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico (Figura 5B) (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Figura 5 – Mecanismos moleculares envolvidos na LTP. Imagens A e B: *fase precoce* da LTP. Imagens C e D: *fase tardia* da LTP.



Fonte: **Adaptado de** LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. *Nature*, v. 5, n. 1, p. 45-54, Jan. 2004.

Portanto, o NO tem um papel crítico na expressão da LTP, que pode ser definida como uma forma de plasticidade sináptica caracterizada pelo aumento da transmissão ou magnitude sináptica em resposta à estimulação repetitiva dos terminais pré-sinápticos (HUANG, 1997). A LTP é um fenômeno típico das sinapses glutamatérgicas e um correlato sináptico de processos de aprendizagem e memória, bastante pronunciado em centros cerebrais envolvidos em funções cognitivas, especialmente o córtex cerebral e hipocampo (ESPLUGUES, 2002).

A ação dos mensageiros retrógrados como o NO explica apenas a *fase precoce* da LTP (Figura 5B), que dura somente algumas horas (2–3 horas), independe da expressão gênica e síntese de proteínas e caracteriza o substrato molecular da memória de curto prazo. A *fase tardia* da LTP caracteriza o substrato molecular da memória de longo prazo, dura várias horas *in vitro* e meses *in vivo*, requer expressão gênica, síntese de proteínas e a formação de novas conexões sinápticas (LYNCH, 2004). Nesta fase, observam-se mudanças morfológicas, como aumento do número de receptores glutamatérgicos e vesículas sinápticas, além do crescimento de novas espinhas dendríticas e divisão de uma espinha pré-existente em dois terminais pré-sinápticos funcionais (Figura 5C e 5D) (LAMPRECHT; LEDOUX, 2004).

O NO também está vinculado com a liberação de outros neurotransmissores, como acetilcolina, noradrenalina, dopamina e serotonina, além de contribuir para a sobrevivência neuronal (ESPLUGUES et al., 2002; GUIX et al., 2005).

Em quantidades fisiológicas o NO age como neuroprotetor (CALABRESE et al., 2007; LEONELLI; TORRÃO; BRITTO, 2009), porém em altas concentrações pode funcionar como um potente agente neurotóxico, especialmente devido à produção de espécies reativas de oxigênio, como o peroxinitrito, que está relacionado à gênese e evolução de doenças neurodegenerativas (GUIX et al., 2005; CALABRESE et al., 2007), problemas de memória (REIS et al., 2002), altos níveis de ansiedade (BOUAYED; RAMMAL; SOULIMANI, 2009), entre outros.

Dados farmacológicos e bioquímicos mostram que a via L-arginina-NO apresenta um importante papel na regulação da susceptibilidade e adaptação ao estresse. Ratos submetidos ao estresse agudo por imobilização apresentam aumento da ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE), níveis plasmáticos elevados de corticosterona e NO_x (nitrito e nitrato) reduzidos no cérebro. Estes efeitos podem ser minimizados pela administração prévia de L-arginina (MASSOD et al., 2003, 2004; GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006; GULATI; CHAKRABORTI; RAY, 2009; ANAND; KAVITA; RAY, 2012) e agravados pela administração de L-NAME, um inibidor da atividade da enzima NOS (MASSOD et al., 2003, 2004; GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006).

Por outro lado, ratos induzidos ao estresse crônico por imobilização não demonstram prejuízos comportamentais significativos no LCE, apresentam níveis baixos de corticosterona e uma reversão quase total dos níveis de NO_x cerebral em

comparação aos animais submetidos ao estresse agudo. Estes animais mostram assim uma adaptação ou tolerância ao estresse, que pode ser potencializada pela administração prévia de L-arginina (GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006; ANAND; KAVITA; RAY, 2012) ou prejudicada pelo pré-tratamento com L-NAME (ANAND; KAVITA; RAY, 2012).

Existem contradições importantes nos estudos que abordam os efeitos do ECM na atividade da nNOS hipocampal. Um estudo mostrou que o ECM provoca alterações na morfologia hipocampal, aumento das espécies reativas de oxigênio e prejudica a atividade da enzima nNOS do hipocampo de camundongos. Estas alterações contribuem para os déficits de aprendizagem e memória apresentados por estes animais em testes como esQUIVA inibitória e campo aberto, que também podem ser provocadas por inibidores da nNOS (PALUMBO et al., 2007). Outros estudos, ao contrário, mostram que o ECM provoca a super-expressão da enzima nNOS, e a produção excessiva de NO está vinculada com a patogênese da depressão, na medida em que suprime a neurogênese hipocampal (ZHOU et al., 2007; HUA et al., 2008). O comportamento de desespero e prejuízo da neurogênese hipocampal pode ser prevenido ou suprimido por *knockout* do gene que codifica a nNOs ou por inibidores desta enzima, e estratégias terapêuticas que visem inibir a atividade da nNOs podem ser interessantes para o tratamento da depressão (ZHOU et al., 2007).

1.3 CREATINA

1.3.1 Descrição geral

A creatina (do grego *kreas*, que significa carne) foi descoberta em 1835 pelo cientista francês Michel Eugene Chevreul, que relatou ter encontrado um novo constituinte orgânico da carne e nomeou. Em 1847, Justus von Liebig observou a presença da creatina como um constituinte regular da carne animal, verificando que a mesma apresentava-se em maior quantidade em animais selvagens, que são fisicamente mais ativos do que animais vivendo em cativeiro. Em 1880, os pesquisadores Max von Pettenkofer e Wilhelm Heinrich Heintz, descobriram uma substância na urina, produto do metabolismo da creatina, nomeada por Liebig de creatinina. Estes pesquisadores mensuraram a concentração de creatinina e

descobriram que a mesma estava diretamente relacionada com a quantidade de massa muscular. A fosfocreatina foi descoberta por Cyrus Fiske e Yallapragada Subbarow em 1927. Em 1934, Lohmann descobriu a reação da creatina quinase descrita adiante (DEMANT; RHODES, 1999; WILLIAMS; KREIDER; BRANCH, 2000).

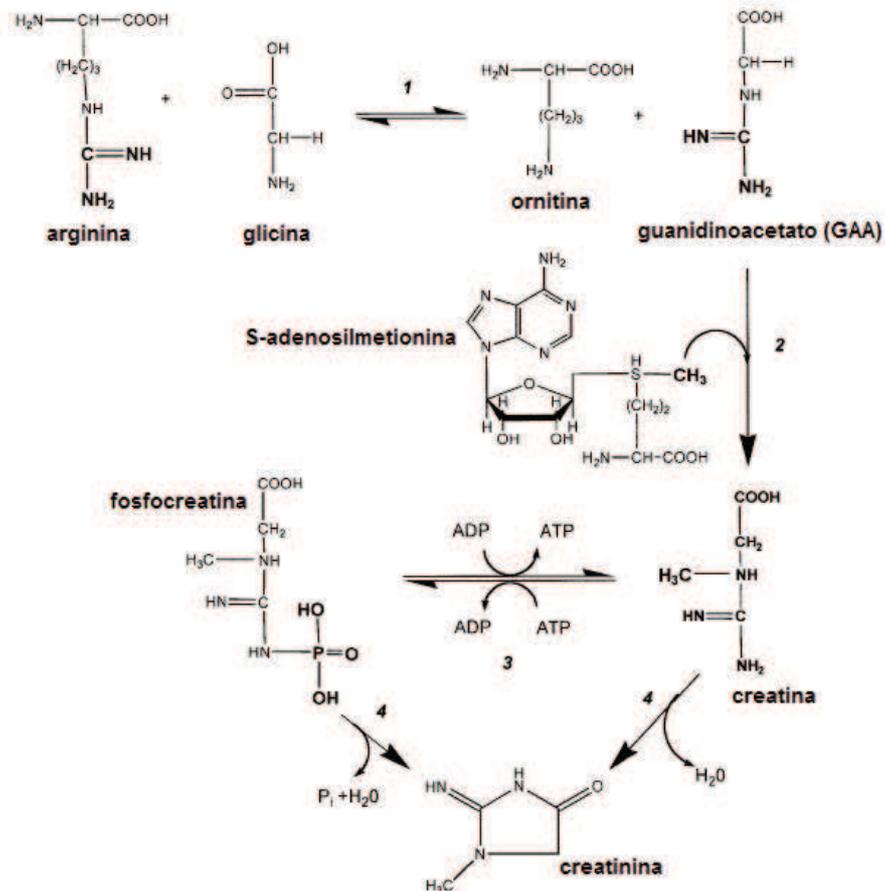
A creatina (ácido alfa-metil guanidino acético) é uma amina nitrogenada distribuída por todo o corpo, sendo 95% armazenada no músculo esquelético e o restante no cérebro, fígado, rins e testículos (PERSKY; BRAZEAU, 2001). Em torno de 1/3 do total de creatina corporal aparece na forma livre e 2/3 na forma fosforilada, chamada de fosfocreatina (PADDON-JONES; BORSHEIM; WOLFE, 2004).

Cerca de 1g/dia da creatina corporal é obtida pela dieta onívora, especialmente envolvendo carnes e peixes, e o restante é sintetizada endogenamente na taxa de 1g/dia em órgãos como rins, fígado, pâncreas e cérebro (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000; ANDRES et al., 2008). A degradação da creatina ocorre mediante uma reação não enzimática e irreversível, formando a creatinina, que uma vez formada, entra na circulação por difusão e é eliminada do corpo pela filtração glomerular (DEMANT; RHODES, 1999; PERSKY; BRAZEAU, 2001).

1.3.2 Síntese de creatina

A síntese de creatina (Cr) ocorre a partir dos aminoácidos arginina, glicina e metionina. O primeiro passo da reação ocorre mediante a transferência do grupo amino da arginina para a glicina, formando o guanidinoacetato (GAA) e a ornitina, em uma reação catalisada pela enzima arginina: glicina amidino-transferase (AGAT) (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000; DERAIVE et al., 2004). O segundo passo caracteriza-se pela transferência do grupo metil da metionina, encontrado na forma de S-adenosilmetionina, para o guanidinoacetato, em uma reação catalisada pela enzima S-adenosilmetionina: guanidinoacetato N-metiltransferase (GAMT), formando assim a creatina (PERSKY; BRAZEAU 2001). As etapas da síntese e degradação da creatina podem ser visualizadas na Figura 6.

Figura 6 – Etapas do metabolismo da creatina.



(1) Reação catalisada pela AGAT, (2) reação catalisada pela GAMT, (3) reação catalisada pela creatina quinase (CK), (4) reação não-enzimática espontânea.

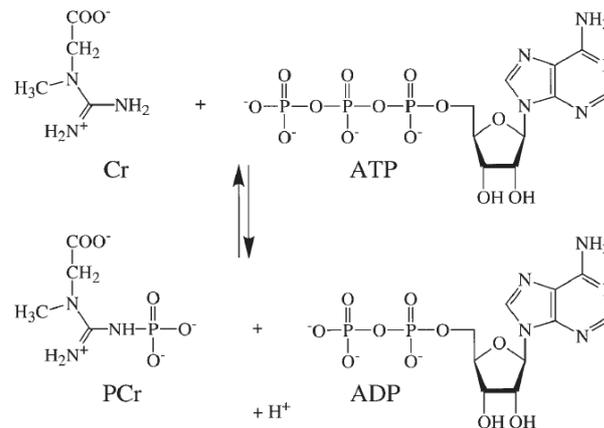
Fonte: **Adaptado de** PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A. Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate. *Pharmacol Rev*, v. 53, n. 2, p. 161-176, Jun. 2001.

1.3.3 Transporte e metabolismo da creatina

Como a creatina é produzida em determinados órgãos e utilizada por outros, ela precisa ser transportada dos seus locais de síntese para as regiões de armazenamento e utilização. A creatina entra na circulação por difusão e é captada pelos tecidos mediante um processo ativo realizado por transportadores Na^+/Cl^- dependentes que trabalham contra gradiente de concentração (PERSKY; BRAZEAU, 2001; PADDON-JONES; BORSHEIM; WOLFE, 2004).

Em uma reação reversível catalisada pela creatina quinase (CK), creatina e ATP reagem e formam a fosfocreatina (PCr) e ADP (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). As reações químicas catalisadas pela creatina quinase podem ser visualizadas na Figura 7.

Figura 7 – Reações químicas catalisadas pela creatina quinase.



Fonte: **Adaptado de** WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiol Rev*, v. 80, n. 3, p. 1107-213, Jul. 2000.

A CK apresenta isoformas citosólicas e mitocondriais. As isoformas citosólicas apresentam as subunidades M-CK (M para músculo) e B-CK (B para cérebro). Estas subunidades formam moléculas diméricas, dando origem às isoformas MM-CK, encontradas predominantemente na musculatura esquelética, as isoformas BB-CK, presentes principalmente no cérebro e músculo liso e as isoformas MB-CK, encontradas predominantemente na musculatura cardíaca. As isoformas mitocondriais podem ser uMt-CK (ubíquas) e sMt-CK (sarcoméricas), e localizam-se no espaço intermembrana mitocondrial. Estas formam moléculas homo-diméricas e homo-octaméricas, as quais são rapidamente intermutáveis (WALLIMANN et al., 1992; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000).

A maioria dos tecidos dos vertebrados expressam duas combinações de isoformas. As isoformas MM-CK e sMt-CK são expressas diferencialmente no músculo sarcomérico, cardíaco e esquelético, enquanto que a combinação BB-CK com uMt-CK são proeminentemente expressas no tecido nervoso, células fotorreceptoras da retina, células ciliadas do ouvido interno, músculo liso, rins, células endoteliais, espermatozóides e pele. A isoforma MB-CK híbrida é expressa somente durante a diferenciação muscular e persiste em níveis baixos no tecido muscular cardíaco adulto (ANDRES et al., 2008).

O sistema Cr/PCr/CK desempenha um importante papel no metabolismo energético. Quando a demanda energética aumenta, por exemplo, durante o exercício intenso, as enzimas CK catalisam a transferência do fosfato da PCr para o ADP, produzindo ATP e Cr. Este mecanismo pode fornecer energia em altas taxas, porém por um curto período de tempo (10-15 segundos) até o esvaziamento do

estoque de PCr (PERSKY; BRAZEAU, 2001; PADDON-JONES; BORSHEIM; WOLFE, 2004). Desta forma, o sistema Cr/PCr/CK funciona como um tampão de energia⁴ e pH, atuando também na regulação da glicólise (DEMANT; RHODES, 1999, PERSKY; BRAZEAU, 2001; PADDON-JONES; BORSHEIM; WOLFE, 2004).

A suplementação com creatina tem sido largamente utilizada como um auxílio ergogênico por indivíduos que buscam melhorar o desempenho em exercícios de curta duração e alta intensidade (MENDES; TIRAPEGUI, 2002; KREIDER, 2003). Há evidências de que a suplementação com esta substância promove ganhos em força, potência e massa muscular (LAWLER et al., 2002; KREIDER; JUNG, 2011).

Os benefícios da suplementação com creatina no sistema muscular estão bem documentados pela literatura. Entretanto, a suplementação com esta substância também vem mostrando importantes atividades antioxidantes (LAWLER et al., 2002), e esta propriedade pode prevenir o sistema nervoso contra danos oxidativos causados pelos radicais livres (SESTILI et al., 2006; YOUNG et al., 2010).

1.3.4 Creatina e doenças neurológicas

As doenças neurológicas compartilham um grande número de similaridades em termos de mecanismos bioquímicos envolvidos em sua gênese e fenótipo clínico, e estes incluem depleção energética, estresse oxidativo, excitotoxicidade e disfunções mitocondriais (ADHIHETTY; BEAL, 2008). Embora estes processos possam estar diretamente ou indiretamente envolvidos na patogênese destas doenças, eles convergem em um produto final que pode ser a necrose ou apoptose celular (ANDRES et al., 2008).

A creatina tem mostrado efeitos neuroprotetores em uma variedade de modelos de doenças neurodegenerativas, como nas Doenças de Alzheimer (DA), Parkinson (DP), Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Nas fases iniciais da DA, a suplementação com creatina mostrou-se capaz de prevenir ou atrasar o curso da degeneração neuronal (BÜRKLEN et al., 2006), proteger os neurônios de insultos neurotóxicos induzidos pela excitotoxicidade glutamatérgica ou pela exposição às proteínas β -amilóide (BREWER; WALLIMANN, 2000), melhorar a

⁴O sistema Cr/PCr/CK funciona como um tampão energético temporário em tecidos com significativa e flutuante demanda energética, como o tecido muscular e nervoso, em que o consumo de ATP excede a sua síntese (WILLIAMS; KREIDER; BRANCH, 2000).

atividade mitocondrial e com isso aumentar a densidade de espinhas dendríticas e sinapses em neurônios cultivados *in vitro* (LI et al., 2004).

A depleção de dopamina característica da DP pode ser induzida pela administração sistêmica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que é convertida em MPP (1-metil-4-fenil-piridina), e esta por sua vez inibe o Complexo I da cadeia transportadora de elétrons, prejudicando a fosforização oxidativa e a subsequente produção de ATP (PERSKY; BRAZEAU, 2001). A suplementação com creatina mostrou-se capaz de proteger neurônios dopaminérgicos de camundongos contra a redução de dopamina induzida por MPTP, bem como a perda de corpúsculos de Nissl e neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase da substância negra (MATTHEWS et al., 1999). Em um estudo clínico, a suplementação com creatina provocou uma melhora no humor dos pacientes e auxiliou na redução da dose de medicamentos anti-parkinsonianos, porém nenhum efeito significativo na Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS) e SPECT foi verificado (BENDER et al., 2006).

A Doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa que envolve disfunções mitocondriais, danos oxidativos e alterações transcricionais deletérias (HERSCH et al., 2006). A suplementação com creatina pode oferecer um meio viável para tratar o déficit no metabolismo enérgico em função das disfunções mitocondriais, reduzindo assim a deterioração neuronal (ANDRES et al., 2008). Esta propriedade foi mostrada em estudos, em que a administração de creatina melhorou o desempenho motor, atenuou a perda de peso corporal e cerebral, reduziu a atrofia neuronal e estendeu a sobrevivência em modelos de *camundongos* transgênicos com DH (FERRANTE et al., 2000; ANDREASSEN, et al., 2001; DEDEOGLU et al., 2003). A creatina pode ser uma estratégia terapêutica relativamente segura e imediatamente disponível para pacientes com DH, servindo assim de base para um tratamento combinado para atrasar a progressão da DH (RYU et al., 2005). Em um estudo clínico, a suplementação com creatina mostrou-se segura, tolerável e biodisponível em nível cerebral, mostrando ação antioxidante por diminuir os níveis séricos do biomarcador 8-hidroxi-2-deoxiguanosina em pacientes com DH (HERSCH et al., 2006).

Na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), disfunções mitocondriais e a

consequente redução dos níveis de ATP contribuem para a morte de neurônios motores que é característica da doença. A suplementação com creatina pode agir como neuroprotetora nessa alteração bioenergética, fornecendo um paradigma de tratamento eficaz para pacientes com ELA (ADHIHETTY; BEAL, 2008). Em ratos transgênicos com ELA, a suplementação com creatina promoveu melhora no desempenho motor, reduziu o dano oxidativo e protegeu contra a perda de neurônios da substância negra e córtex motor, aumentando a expectativa de vida dos animais (KLIVENYI et al., 1999; ZHANG; NARAYANAN; FRIEDLANDER, 2003).

É importante ressaltar que nenhuma eficácia da suplementação com creatina foi observada na progressão da doença e sobrevivência de pacientes com ELA, por isso algumas questões precisam ser ajustadas, entre elas, a dose administrada (GROENEVELD et al., 2003; SHEFNER et al., 2004; LI et al., 2004).

A suplementação com creatina também pode oferecer neuroproteção em doenças neurológicas agudas, como isquemia e traumatismo crânio-encefálico, as quais envolvem insultos que comprometem a bioenergética mitocondrial. Pesquisadores mostraram que camundongos com isquemia cerebral focal transitória tratados com creatina apresentaram redução da lesão cerebral sem alterações significativas dos níveis de Cr, PCr e ATP cerebrais (PRASS et al., 2007). Em outro estudo, pesquisadores observaram que ratos com isquemia cerebral focal que receberam PCr apresentaram melhor pontuação em testes neurocomportamentais, menor volume do infarto e diminuição do inchaço cerebral (LI; WANG; ZHAO, 2012).

Em casos de lesão cerebral traumática, os resultados mostraram que a administração crônica de creatina diminui a extensão da lesão cortical em mais de 36% em camundongos e 50% em ratos, sendo observado também uma melhora na atividade mitocondrial vinculada à produção de ATP (SULLIVAN et al., 2000). Em um estudo clínico, Sakellaris et al. (2006), observaram que a administração crônica de creatina em crianças e adolescentes com traumatismo crânio-encefálico promoveu melhora em vários parâmetros, como cognição, locomoção, sociabilidade, personalidade, cuidados pessoais e comunicação.

A suplementação com creatina também mostrou benefícios em problemas vinculados a erros congênitos do metabolismo, como encefalopatias mitocondriais, síndrome de deficiência de creatina e hiperamonemia (ANDRES et al., 2008).

1.3.5 Creatina e doenças psiquiátricas

A maioria das doenças psiquiátricas apresentam disfunções bioenergéticas, as quais parecem estar vinculadas com a gênese de muitas destas condições (REZIN et al., 2008, SHAO et al., 2008; ALLEN, 2012). Segundo Allen (2012), pacientes, pesquisadores e clínicos vêm mostrando um crescente interesse em conhecer os possíveis efeitos positivos da suplementação com creatina em doenças psiquiátricas.

Em modelos animais de depressão, a suplementação oral com creatina mostrou-se eficaz, e seus efeitos antidepressivos são provavelmente mediados pela ativação de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ (CUNHA et al., 2012). Entretanto, evidências mostram que a suplementação com creatina em roedores parece ser sexo-dependente, pois a mesma mostrou-se antidepressiva apenas em ratas (ALLEN et al., 2010).

Em um recente estudo clínico, pesquisadores agregaram creatina a um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS) e perceberam que mulheres diagnosticadas com transtorno depressivo maior que receberam creatina, apresentaram uma significativa melhora nos sintomas da depressão, um fator observado a partir da 2^a semana de tratamento e mantido até o final. Estes pesquisadores concluíram que a creatina associada ao tratamento convencional com antidepressivos pode ser uma estratégia terapêutica promissora para uma recuperação mais rápida (LYOO et al., 2012).

Três questões importantes precisam ser consideradas quanto à gênese e tratamento dos sintomas da esquizofrenia: (a) problemas no metabolismo energético podem prejudicar os processos de sinalização neuronal e contribuir para o aparecimento de sintomas negativos e positivos da doença; (b) prejuízos no sistema Cr/PCr/CK foram observados em regiões cerebrais relacionadas com as emoções e funções executivas de pacientes esquizofrênicos e (c) estudos têm encontrado uma associação entre metabolismo de creatina e funções cognitivas de pacientes esquizofrênicos (ALLEN, 2012).

A suplementação crônica com creatina não mostrou resultados superiores ao placebo para amenizar os sintomas de pacientes com esquizofrenia (KAPTSAN et al., 2007). Contudo, a esquizofrenia é uma doença bastante heterogênea em termos de sintomas neuropsicológicos e formas de tratamento, por isso muitos fatores

precisam ser reavaliados, por exemplo, o período da doença em que a suplementação deve ser realizada. A creatina pode auxiliar durante o primeiro episódio psicótico ou durante o período crítico do desenvolvimento, levando em consideração que a esquizofrenia é uma patologia relacionada a problemas no neurodesenvolvimento (ALLEN, 2012).

Evidências de disfunções mitocondriais vêm sendo relatadas em pacientes com transtorno bipolar (YOUNG, 2007; KATO, 2008), porém existem poucos estudos envolvendo a suplementação com creatina em pacientes bipolares (ALLEN, 2012). Roitman et al. (2007) verificaram que pacientes bipolares suplementados com creatina tiveram precipitação no aparecimento do episódio maníaco ou hipomaníaco.

Segundo Allen (2012) estudos mostram benefícios terapêuticos da suplementação com creatina em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático (TEPT), porém em outros transtornos de ansiedade, os efeitos desta substância ainda precisam ser avaliados. A suplementação com creatina em pacientes com TEPT e resistentes ao tratamento farmacológico resultou em melhora dos sintomas da ansiedade e depressão (AMITAL et al., 2006b). Efeitos positivos da suplementação com esta substância também foram observados em uma mulher de 56 anos sofrendo de TEPT, depressão e fibromialgia (AMITAL et al., 2006a).

1.3.6 Creatina e funções cognitivas

Estudos mostram uma íntima relação entre o sistema Cr/PCr/CK com as funções cognitivas em humanos e roedores. Pesquisadores observaram que camundongos com *knockout* de um gene que codifica as isoformas CK-BB cerebrais apresentaram dificuldades na habituação no campo aberto e aprendizagem prejudicada no labirinto aquático de Morris. Este déficit pode ser mantido até aproximadamente 24 meses de idade e está neurobiologicamente relacionado à perda de conexões das fibras musgosas do hipocampo (JOST et al., 2002). Já camundongos com *knockout* das isoformas BB-CK e uMt-CK cerebrais demonstram um prejuízo acentuado na aprendizagem espacial, redução no peso corporal e cerebral e diminuição no tamanho hipocampal. Estas alterações sugerem que a perda das referidas isoformas diminui a eficiência do cérebro em lidar com atividades cognitivas e sensoriais (STREIJGER et al., 2005).

Poucos estudos avaliam os efeitos da suplementação com creatina no

desempenho cognitivo de humanos e os dados disponíveis sugerem que a suplementação com esta substância promove efeitos significativos somente em indivíduos com prejuízos cognitivos e psicomotores (OWEN; SUNRAM-LEA, 2011).

Pesquisadores mostraram que jovens saudáveis que receberam a suplementação crônica com creatina não apresentaram melhora em funções como tempo de reação, processamento de informação, raciocínio e memória (RAWSON, et al. 2008). Entretanto, indivíduos vegetarianos saudáveis, os quais obtêm creatina somente de forma endógena, são beneficiados pela suplementação, melhorando seu desempenho em testes de memória de trabalho e inteligência, os quais exigem velocidade de processamento (RAE et al., 2003).

Idosos que receberam creatina tiveram desempenho superior ao grupo controle em tarefas de memória espacial de trabalho e memória de longo prazo (McMORRIS et al., 2007b). Esta população é beneficiada com a suplementação com creatina em função do prejuízo metabólico e deficiência nutricional vinculado com a idade (OWEN; SUNRAM-LEA, 2011).

1.3.7 Relações entre creatina e estresse psicológico

O estresse também está associado a prejuízos no metabolismo energético cerebral. Os hormônios do estresse podem inibir a atividade da cadeia respiratória mitocondrial, produção energética e consumo de oxigênio, aumentando a susceptibilidade de neurônios aos efeitos de espécies reativas de oxigênio, que inclui peroxidação lipídica, carboxilação de proteínas, danos ao DNA e apoptose (MADRIGAL et al. 2001; SEIFRIED, 2007).

Os efeitos do estresse no metabolismo de creatina não foram diretamente abordados em humanos, mas os prejuízos desta condição na concentração de metabólitos cerebrais foi alvo de estudo em modelos animais de estresse (ALLEN, 2012). Usando imagens de Espectroscopia por Ressonância Magnética (ERM) e técnicas de histologia, pesquisadores demonstraram que a exposição ao estresse crônico não provoca somente a redução do volume hipocampal e alterações negativas na neurogênese, mas altera significativamente as concentrações de metabólitos cerebrais, como a creatina e fosfocreatina, as quais decrescem em aproximadamente 15% (CZÉH et al., 2001; VAN DER HART et al., 2002). O decréscimo nas concentrações de creatina também foi observado no córtex pré-

frontal medial (KNOX et al., 2010).

Em um estudo com pintos submetidos ao estresse de separação social, o tratamento agudo com creatina foi capaz de atenuar as respostas do estresse, como vocalizações, atividade espontânea e concentrações elevadas de corticosterona. Estes efeitos foram atribuídos à ativação de receptores GABA-A cerebrais (KOGA et al., 2005).

A creatina também mostrou efeitos benéficos em humanos submetidos a condições estressantes. A suplementação com esta substância melhorou o humor, desempenho psicomotor e cognitivo de adultos submetidos a exercícios associados a 24 horas de privação de sono (McMORRIS et al., 2006). Em humanos sob 36 horas de privação de sono, a suplementação com creatina melhorou o desempenho em tarefas de memória espacial (McMORRIS et al., 2007a). A privação de sono é considerada um estressor que induz à elevação de cortisol (humanos) ou corticosterona (roedores) (PALMA et al., 2007).

Considerando o impacto negativo do estresse crônico na qualidade de vida das pessoas, torna-se fundamental o desenvolvimento de pesquisas que possam futuramente se tornarem estratégias terapêuticas que visem proteger os indivíduos dos males oriundos desta condição. O contexto apresentado mostrou importantes relações do sistema Cr/PCr/CK e da via L-arginina-NO em condições fisiologicamente normais e fisiopatológicas do SNC, inclusive em alterações provocadas pelo estresse. Levando em conta estas questões, essa pesquisa busca responder a seguinte problematização: Quais os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a atividade locomotora e ansiedade de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Avaliar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre o comportamento alimentar de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Verificar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de referência e de trabalho de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Examinar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 35 ratos machos albinos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* com 120 dias, pesando entre 342-415g provenientes do biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Com exceção às atividades de estresse e tarefas comportamentais, os animais foram mantidos em suas caixas-moradias em base de polipropileno, autoclavável nas medidas de 41 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto com maravalha. Admitiu-se no máximo 3-4 animais por caixa.

Os animais foram alojados em um local com temperatura controlada ($26^{\circ}\pm 1$), ciclo claro-escuro de 12 horas, tratados com ração para roedores da marca PURINA[®]. A água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento (exceto para os animais dos grupos submetidos ao estresse crônico durante o período em que o estressor aplicado foi a privação de alimento).

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Exercício (LBE) da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, *campus* de Irati - PR.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNICENTRO (protocolo 015/2011).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

De maneira aleatória, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, constituídos da seguinte maneira:

- Controle total (Ct): 7 animais sem receber o modelo de estresse crônico variado (ECV) e tratamento.
- Estresse crônico (Ec): 7 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com uma solução veículo.
- Estresse crônico + L-arginina (Ec/La): 7 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com L-arginina.
- Estresse crônico + creatina (Ec/Cr): 7 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com creatina.

- Estresse crônico + L-arginina + creatina (Ec/La+Cr): 7⁵ animais recebendo o modelo de ECV e tratados com L-arginina e creatina.

O tratamento ocorreu durante todo o experimento (40 dias de estresse + tarefas comportamentais), por meio da técnica de gavagem, uma vez por dia, sempre no mesmo horário (12 horas). Buscou-se evitar qualquer forma de estresse nos animais do grupo Ct, por isso optou-se por não utilizar o procedimento de gavagem nestes animais. Os animais dos demais grupos foram submetidos aos tratamentos nas seguintes dosagens:

- Grupo Ec: solução veículo de 1ml contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/La: solução de 1ml composta por 500mg/Kg de L-arginina + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/Cr: solução de 1ml contendo 300mg/Kg de creatina monohidratada + 0,5% de CMC e água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/La+Cr: solução de 1,5ml contendo 500mg/Kg de L-Arginina + 300mg/Kg de creatina monohidratada + 0,5% de CMC e água purificada q.s.p.

A escolha da dosagem de L-arginina levou em consideração dois aspectos principais: neurotoxicidade e saturação. O excesso de NO pode aumentar os níveis de radicais livres, e como mostrado anteriormente, estas moléculas estão envolvidas na gênese e evolução de distúrbios neurológicos (GUIX et al., 2005; CALABRESE et al., 2007). Os radicais livres também prejudicam a atividade das enzimas Na⁺, K⁺ - ATPases e promovem déficits de memória em ratos (WYSE et al., 2001; REIS et al., 2002).

Pesquisadores mostraram que a L-arginina administrada via intravenosa nas doses de 250mg/Kg, 500mg/Kg e 1000mg/Kg aumenta em aproximadamente 33, 48 e 50% os níveis de NO hipocampal, respectivamente. Isto mostra claramente que a captação de L-arginina pelo cérebro é limitada (GUPTA et al., 2005).

A administração oral de L-arginina (500mg/Kg) mostrou-se eficaz no processo de adaptação de ratos ao estresse agudo por frio-hipóxia-imobilização (GUPTA et al., 2005). Esta mesma dosagem, quando administrada via intraperitoneal melhorou parâmetros bioquímicos e comportamentais vinculados à ansiedade de ratos submetidos ao estresse agudo e crônico por immobilização (MASSOD et al., 2003,

⁵1 animal morreu durante o processo de gavagem.

2004; GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006; GULATI; CHAKRABORTI; RAY, 2009).

A escolha da dosagem de creatina (300mg/Kg via oral) levou em consideração a efetividade desta em estudos envolvendo modelos experimentais de doenças neurológicas. Esta dosagem foi capaz de minimizar episódios convulsivos (comportamentais e eletrográficos), níveis da proteína carbonil e prejuízos na atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATPases induzidas pelo ácido glutárico em ratos (MAGNI et al., 2007) e também decresceu marcadores do estresse oxidativo (proteína carbonil e TBARS) em um modelo experimental de traumatismo crânio-encefálico severo (SARAIVA et al., 2012).

3.3 MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

O modelo de estresse crônico variado utilizado neste trabalho é uma adaptação dos modelos de Gamaro et al. (2003a, 2003b) e Vasconcellos et al. (2003, 2005). Somente os animais do grupo Ct permaneceram em suas caixas-moradias durante todo o experimento, recebendo somente cuidados diários comuns, como troca de maravalha, água e ração.

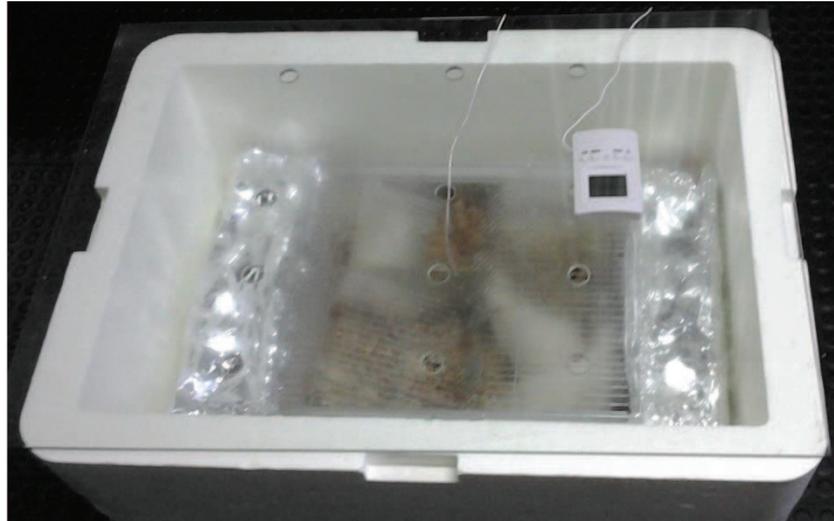
Os estressores utilizados foram:

- a) Ambiente congestionado (7 animais por caixa-moradia durante 24 horas)
- b) Exposição ao frio (1 hora)
- c) Imobilização (1-2 horas)
- d) Inclinação da caixa-moradia em um ângulo aproximado de 45° (2-4 horas)
- e) Luz intermitente (1-2 horas)
- f) Privação de alimento (24 horas)
- g) Ruído (15-40 minutos)

Aplicou-se diariamente e de forma aleatória, 1 entre os 7 estressores acima, em períodos e horários diferentes na tentativa de minimizar a previsibilidade do animal em relação ao estressor (VASCONCELLOS et al., 2005).

O estresse por inclinação da caixa-moradia ocorreu através da inserção de um tijolo abaixo da mesma. Para a realização da exposição ao frio, utilizou-se uma caixa de isopor de 80 litros ventilada com a temperatura aproximada de 5 a 7°C controlada por dois termômetros da marca INCOTERM® (Figura 8).

Figura 8 – Caixa térmica ventilada.



Fonte: o autor.

Na atividade de imobilização, os animais foram inseridos no interior de garrafas *Pet* de *Coca Cola*® de 600 ml, ficando impossibilitados de se locomover, porém livres para a realização dos movimentos respiratórios necessários (Figura 9). O ruído foi realizado por meio de 3 alarmes magnéticos de 90db cada, fixados nas paredes do ambiente em que os animais eram mantidos.

Figura 9 – Estresse por imobilização



Fonte: o autor.

Para a exposição ao estressor “luz intermitente” as caixas-moradias foram agrupadas em um ambiente ausente de iluminação contendo 4 lâmpadas “pisca-pisca” de 15 watts cada.

A exposição ao estresse aconteceu durante 40 dias, período necessário para

que os déficits de memória espacial se manifestem e que níveis de corticosterona se elevem em torno de 90% (VASCONCELLOS et al., 2005).

Quadro 2 – Calendário geral, natureza e duração dos estressores aplicados.

Dia	Estressor aplicado	Duração
1	Ruído	15 minutos
2	Privação de alimento	24 horas
3	Luz intermitente	1 hora
4	Inclinação da caixa-moradia	2 horas
5	Ambiente congestionado	24 horas
6	Privação de alimento	24 horas
7	Imobilização	1 hora
8	Exposição ao frio	1 hora
9	Ruído	20 minutos
10	Luz intermitente	2 horas
11	Inclinação da caixa-moradia	2 horas
12	Imobilização	1 hora
13	Nenhum estressor aplicado	---
14	Privação de alimento	24 horas
15	Ambiente congestionado	24 horas
16	Ruído	30 minutos
17	Luz intermitente	2 horas
18	Inclinação da caixa-moradia	2 horas
19	Privação de alimento	24 horas
20	Ambiente congestionado	24 horas
21	Luz intermitente	2 horas
22	Imobilização	1 hora
23	Ruído	25 minutos
24	Luz intermitente	2 horas
25	Privação de alimento	24 horas
26	Ambiente congestionado	24 horas
27	Inclinação da caixa-moradia	3 horas
28	Exposição ao frio	1 hora
29	Imobilização	1,5 horas
30	Ruído	30 minutos
31	Inclinação da caixa-moradia	4 horas
32	Privação de alimento	24h
33	Nenhum estressor aplicado	----
34	Ambiente congestionado	24 horas
35	Exposição ao frio	1 hora
36	Imobilização	2 horas
37	Ruído	40 minutos
38	Luz intermitente	2 horas
39	Inclinação da caixa-moradia	4 horas
40	Ambiente congestionado	24 horas

Fonte: o autor

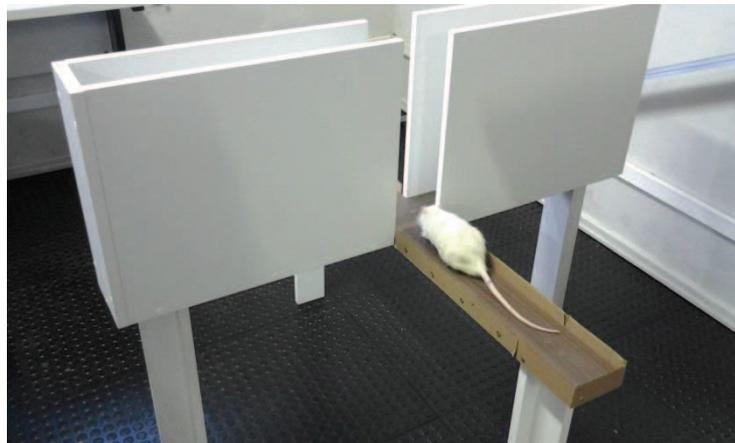
3.4 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Em torno de 24 horas após a última sessão de estresse, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, conforme a sequência abaixo:

3.4.1 Labirinto em cruz elevado

É um equipamento desenvolvido por Pellow et al. (1985) para avaliar a ansiedade em roedores (Figura 10). Neste estudo, utilizou-se um equipamento constituído de madeira, mantido a 50 cm do chão e composto por 4 braços, sendo 2 abertos (BAs) e 2 fechados (BFs), medindo 50 x 10 cm cada e uma arena central de 10 x 10 cm no cruzamento entre os braços. No 41º dia de experimento, cada animal foi colocado na arena central com a cabeça voltada para um dos BFs e deixado explorar o equipamento por um período de 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram mensurados: (a) número de entradas e tempo de permanência nos BAs (b) número de entradas e tempo de permanência nos BFs (c) percentagem (%) de entradas nos BAs ($\text{entradas nos BAs} / [\text{entradas nos BAs} + \text{entradas nos BFs}] \times 100$) e (d) percentagem (%) de tempo transcorrido nos BAs ($\text{tempo no BAs} / [\text{tempo no BAs} + \text{tempo no BFs}] \times 100$) (MASOOD et al., 2003).

Figura 10 – Labirinto em cruz elevado.



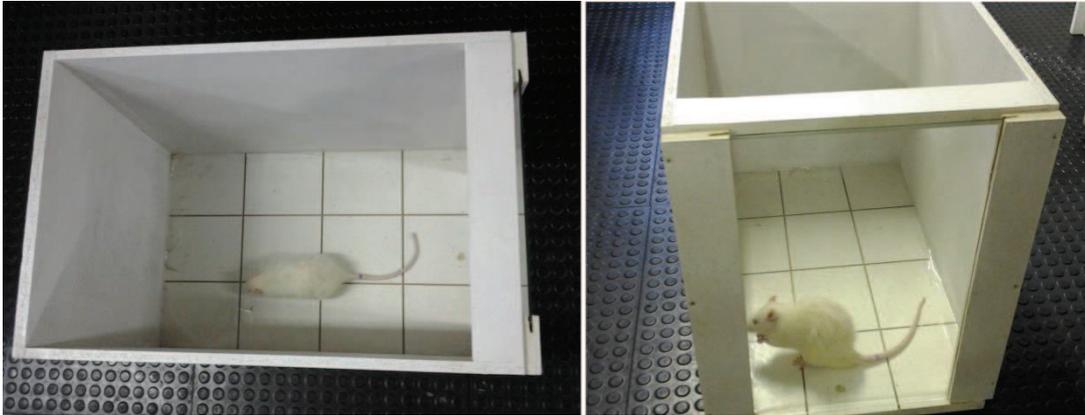
Fonte: o autor

3.4.2 Campo aberto

A análise da atividade locomotora foi realizada por meio da tarefa de campo aberto. Esta tarefa consiste de uma caixa de madeira medindo 50 x 40 x 60 cm, com frente de vidro que permite a visualização do comportamento do animal. O assoalho desta caixa é dividido em 12 quadrantes iguais medindo 15 x 13,3 cm cada (Figura 11). No 42º dia de experimento, cada animal foi gentilmente colocado neste equipamento, com a face virada para um dos vértices do piso e deixado explorar por

um período de 5 minutos. O número de quadrantes percorridos foi utilizado como medida da atividade locomotora do animal.

Figura 11 – Campo aberto.



Fonte: o autor

3.4.3 Tarefa de Comportamento Alimentar

É um procedimento utilizado por Gamaro et al. (2003a) e baseia-se no princípio de que animais cronicamente estressados demonstram uma diminuição no consumo de alimentos açucarados, uma expressão da anedonia, sintoma clássico da depressão maior em humanos (BANERJEE et al., 2012).

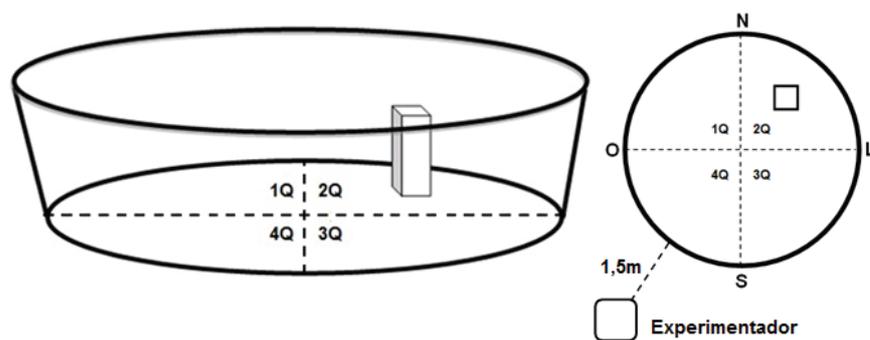
Esta tarefa iniciou-se no 43º dia de experimento. Inicialmente os animais foram habituados em um novo ambiente contendo alimentos doces, isto é, foram colocados na extremidade de uma caixa de madeira retangular com vidro no teto, nas medidas de 40 x 15 x 20 cm, contendo 10 *pellets* do cereal Froot Loops® (roscas de trigo, amido e sacarose) da marca Kellongs®. Os animais passaram por uma sessão diária de 3 minutos cada durante 5 dias consecutivos (43º, 44º, 45º, 46º, 47º dias de experimento) para habituação ao equipamento, sob restrição alimentar todos os dias (aproximadamente 80% da ração ingerida no 42º dia de experimento). No 48º dia de experimento, realizou-se a sessão de teste, também por um período de 3 minutos, porém com os animais alimentados *ad libitum*. Tanto nas sessões de habituação, quanto na sessão de teste, avaliaram-se os seguintes parâmetros: (a) latência para iniciar o consumo de Froot Loops® (b) quantidade de Froot Loops® consumido. Para evitar o viés da observação, a contagem foi realizada sempre pela mesma pessoa.

3.4.4 Labirinto aquático de Morris

A avaliação da memória espacial iniciou-se no 45º dia de experimento. Neste estudo foi utilizado uma versão adaptada do labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984), um tanque circular preto medindo 135 cm de diâmetro preenchido com água em uma temperatura controlada de $21\pm 1^\circ\text{C}$, contendo em seu interior uma plataforma de escape confeccionada em acrílico nas dimensões de 10x10 cm, localizada 1,5 cm abaixo da superfície da água.

O equipamento ficou localizado em uma sala com aproximadamente $7,5\text{m}^2$ cujas paredes eram ricas em pistas visuais, por exemplo, objetos coloridos confeccionados com etileno acetato de vinila (EVA), bem como o experimentador localizado sempre na mesma posição (aproximadamente 1,5m do tanque) para facilitar a orientação do animal. Foi adicionado 300g de amido de milho para tornar a água turva e dificultar a visualização da plataforma pelo animal. Na superfície da circunferência do tanque, também foram inseridos objetos confeccionados com EVA indicando quatro pontos cardeais (norte, sul, leste, oeste), que delimitavam o tanque em quatro quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (1º quadrante, 2º quadrante, 3º quadrante e 4º quadrante) (Figuras 12 e 13). Os pontos cardeais também denotavam as posições de largada dos animais.

Figura 12 – Labirinto Aquático de Morris: Divisão em quadrantes e pontos cardeais.



Fonte: o autor

Figura 13 – Labirinto Aquático de Morris.



Fonte: o autor.

Em cada sessão de nado, os animais foram inseridos pelo experimentador no tanque com o focinho voltado para um dos pontos cardeais e nadavam livremente até encontrar a plataforma, e uma vez nesta, permaneciam por 10 segundos. Caso atingissem o tempo máximo de 60 segundos sem encontrar a plataforma, os animais eram gentilmente conduzidos pelo experimentador até a mesma. Depois de cada sessão de nado, os animais eram secados com auxílio de uma toalha e aquecedor, e posteriormente retornavam às suas caixas-moradias.

Para avaliar a memória espacial de referência foram 5 dias consecutivos de treinamento ou aquisição da memória (45°, 46°, 47°, 48° e 49° dias de experimento) (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005; ROSSATO et al., 2006, 2007). O objetivo principal desta atividade foi encontrar a plataforma fixada sempre no mesmo local (centro do 2º quadrante). Cada animal foi submetido a 4 sessões de nado diárias por um período máximo de 60 segundos (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005), partindo de posições diferentes (Quadro 3). Estabeleceu-se um intervalo de 10 minutos entre cada tentativa.

Quadro 3 – Posições de largada dos animais nos dias de aquisição da memória de referência.

Dia	Posições de largada
1	N – S – L – O
2	O – L – S – N
3	S – O – N – L
4	L – N – O – S
5	N – L – S – O

Fonte: o autor

Em torno de vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento, realizou-se a fase de *retenção* ou teste (50° dia de experimento). Esta fase foi realizada mediante uma única sessão de nado para cada animal, com duração de 60s na ausência da plataforma de escape. Foram avaliados os seguintes parâmetros vinculados à memória espacial de referência: (a) latência para encontrar o local onde estava a plataforma nas sessões de treinamento (b) % tempo de permanência no quadrante alvo (MELLO et al., 2008).

A avaliação da memória espacial de trabalho iniciou-se no 52° dia de experimento, aproximadamente quarenta e oito horas após a sessão de retenção da memória espacial de referência. Esta tarefa utilizou o mesmo equipamento e princípios da tarefa anterior, porém foram quatro dias consecutivos de teste (52°, 53°, 54° e 55° dias de experimento), com a plataforma localizada em posições diferentes a cada dia (Quadro 4). Nas primeiras tentativas de cada dia (fase de aquisição) os animais tiveram que encontrar a plataforma em uma posição diferente, enquanto que nas três tentativas subsequentes (fase de retenção), a plataforma permaneceu sempre na mesma posição, porém os animais iniciavam a sessão a partir de pontos cardeais diferentes (VASCONCELLOS et al., 2003). Estabeleceu-se um intervalo de 5 minutos entre cada tentativa.

Quadro 4 – Localização da plataforma e posições de largada dos animais nos dias de teste da memória de trabalho

Dia	Localização da plataforma	Posições de largada
1	1º Quadrante	N – S – L – O
2	2º Quadrante	O – L – S – N
3	3º Quadrante	S – O – N – L
4	4º Quadrante	L – N – O – S

Fonte: o autor

O desempenho em memória espacial de trabalho foi avaliado mediante o cálculo da latência para encontrar a plataforma nas sessões 1, 2, 3 e 4 durante os 4 dias de teste (NETTO et al., 1993).

3.5 CONSUMO DE RAÇÃO, INGESTÃO DE ÁGUA E PESO CORPORAL

Durante o período de estresse, o consumo de ração e a ingestão de água foram mensurados e expressos em g/100g e ml/100g, respectivamente. As medidas foram realizadas diariamente, sempre no mesmo horário (14 horas). Optou-se por

desconsiderar os dados referentes aos dias em que o estressor “privação de alimento” foi aplicado, bem como aqueles do dia imediatamente posterior (GAMARO et al., 2003a). Para o cálculo do consumo semanal de água ou ração por animal, realizou-se a média semanal do consumo por caixa-moradia e dividiu-se pelo número de animais presentes na mesma. Em seguida, a medida obtida foi dividida pelo peso do animal.

O peso corporal foi aferido semanalmente durante todo o período de estresse. No final dos experimentos (estresse + tarefas comportamentais), obteve-se o peso corporal dos animais para determinar o índice de Lee através da seguinte fórmula:

Figura 14 – Fórmula para o cálculo do índice de Lee.

$$\frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{comprimento naso-anal (cm)}}$$

Fonte: **Adaptado de** MOURA et al. Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Rev Bras Med Esporte**, v.14, n.5, 2008.

3.6 PARÂMETROS ANATÔMICOS E BIOQUÍMICOS

No dia posterior à última sessão de teste comportamental, com 12 horas de jejum, os animais foram sacrificados mediante decapitação, o sangue troncular foi coletado para centrifugação em tubos plásticos à 1000 rpm e o soro retirado para posterior análise bioquímica dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, triglicerídeos e corticosterona.

Os níveis de glicose, colesterol total e triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático e calorímetro (reação de Trinder), utilizando o Kit comercial LABTEST[®], e os resultados foram expressos em mg/dl. A corticosterona foi determinada por quimioluminescência, e os resultados foram expressos em µg/dl.

Após o sacrifício, mensurou-se também o peso relativo do tecido adiposo (gordura das regiões mesentérica, retroperitoneal e periepídimal), fígado, coração, rim e adrenal esquerda. Os dados foram expressos em g de tecido por 100 g de peso corporal (g/100g).

O peso do coração foi utilizado para o cálculo do índice de hipertrofia cardíaca (IHC), expresso pela seguinte relação: peso do coração (mg) / peso do animal (g). (WALLEN et al., 2000).

Quadro 5 – Esquema geral das atividades desenvolvidas

Ordem	Atividade	Duração
1	Exposição aos estressores	40 dias
2	Labirinto em cruz elevado	1 dia
3	Campo aberto	1 dia
4	Tarefa de comportamento alimentar	6 dias
5	Labirinto aquático de Morris – memória espacial de referência	6 dias
6	Labirinto aquático de Morris – memória espacial de trabalho	4 dias
7	Sacrifício, coleta de sangue e órgãos	1 dia

Fonte: o autor

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM), com a utilização do programa *Graphpad Prism* versão 5.0. Utilizou-se ANOVA de medidas repetidas para o cálculo do ganho de peso, consumo de ração e ingestão de água. Optou-se por ANOVA de uma via para os demais parâmetros. Ambos os testes foram seguidos do *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK). Em todos os casos os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão organizados em dois capítulos correspondentes aos seguintes artigos científicos:

Capítulo I – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

Capítulo II – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

4.1 Capítulo I – Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado. Foram utilizados 34 ratos *Wistar* com aproximadamente 120 dias no início dos experimentos. Os animais foram igualmente e aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais: controle (Ct), estresse crônico (Ec), estresse crônico + L-arginina (Ec/La), estresse crônico + creatina (Ec/Cr) e estresse crônico + L-arginina + creatina (Ec/La+Cr). Submeteu-se os animais ao estresse por um período de 40 dias, aplicando diariamente e de maneira aleatória um dos seguintes estressores: ambiente congestionado, exposição ao frio, imobilização, inclinação da caixa-moradia, luz intermitente, privação de alimento e ruído. Em torno de vinte e quatro horas após a última sessão de estresse, os animais foram submetidos às seguintes tarefas comportamentais: labirinto em cruz elevado, campo aberto e tarefa de comportamento alimentar. No dia posterior à última sessão de teste comportamental, os animais foram sacrificados mediante decapitação, o sangue troncular foi coletado para análise bioquímica (glicose, colesterol e triglicerídeos) e o fígado, tecido adiposo (gorduras mesentérica, retroperitoneal e periepídidimal) e rim esquerdo foram pesados. Os resultados mostraram que os animais do grupo Ec, mesmo consumindo maior quantidade de ração e água, tiveram menor ganho de peso corporal e apresentaram outros marcadores biológicos importantes do estresse crônico (por ex. menor volume hepático e glicemia elevada), mostrando também ansiedade no labirinto em cruz elevado e prejuízo locomotor no campo aberto. Os tratamentos não foram capazes de reduzir os efeitos do estresse no consumo de ração/água e glicemia, porém minimizaram o prejuízo deste na atividade locomotora e aumentaram o consumo de alimentos palatáveis (Froot Loops®). O tratamento com creatina bloqueou a perda de peso corporal e hepático induzido pelo estresse. A coadministração de L-arginina e creatina reverteu os efeitos do estresse na perda do tecido adiposo e bloqueou potencialmente os efeitos ansiolíticos do estresse no labirinto em cruz elevado. Concluindo, este estudo mostrou que a coadministração de L-arginina e creatina proporciona melhora em todos os parâmetros comportamentais avaliados, por isso demonstra superioridade em relação à administração isolada destas substâncias.

Palavras-chave: estresse crônico; L-arginina; creatina.

Chapter I – Effects of administration of L-arginine and creatine on behavioral parameters in rats submitted to a model of chronic stress varied.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of administration of L-arginine and creatine on behavioral, biochemical, nutritional and anatomical parameters in rats submitted to a model of chronic variable stress. The study included 34 *Wistar* rats having approximately 120 days at the beginning of the experiments. The animals were equally and randomly divided into five groups: control (Ct), chronic stress (Ec), chronic stress + L-arginine (Ec/La), chronic stress + creatine (Ec/Cr) and chronic stress + L-Arginine + creatine (Ec/La + Cr). The animals were exposed to stress for a period of 40 days and daily and randomly one of the following stressors were applied: crowded environment, exposure to cold, restraint, inclination of home cage, flashing light, food deprivation and noise. About twenty-four hours after the last session of stress, the animals were subjected to the following behavioral tasks: elevated plus-maze, open field task and measurement of palatable food intake. The day after the last test session, the animals were sacrificed by decapitation, trunk blood was collected for biochemical analysis (glucose, cholesterol and triglycerides) and the liver, adipose tissue (mesenteric, retroperitoneal and periepididimal fat) and left kidney were weighed. The results showed that the animals in group Ec, while consuming larger amounts of food and water, had lower body weight gain and showed other important biological markers of chronic stress (eg. lower liver weight and high blood glucose), also showing anxiety in the elevated plus maze and locomotor impairment in open field task. No treatment was able to reduce the effects of stress on lab chow/water intake and glucose, all but minimized the damage in this locomotor activity and increased consumption of palatable food (Froot Loops[®]). The treatment with creatine blocked the liver and body loss weight induced by stress. Coadministration of L-arginine and creatine significantly reversed the effects of stress in the loss of adipose tissue and potentially blocked the anxiolytic effects of stress on the elevated plus maze. In conclusion, this study showed that coadministration of L-arginine and creatine provides improvement in all behavioral parameters evaluated, so it demonstrates superiority over the separate administration of these substances.

Keywords: chronic stress, L-arginine, creatine.

INTRODUÇÃO

O estresse crônico pode ser definido como uma condição resultante da exposição contínua ou repetida a um ou mais estressores ao longo de um período que varia de dias a meses (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Em termos fisiológicos, ocorre a hiperativação da eferência simpática do Sistema Nervoso Autônomo e do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, responsáveis pela liberação de catecolaminas e glicocorticóides (GCs), respectivamente. Os GCs, por exemplo, quando secretados transitoriamente, contribuem para a sobrevivência do organismo, porém em quantidades excessivas podem levar a consequências deletérias, aumentando os riscos de hipertensão, *diabetes mellitus* insulino-dependente, amenorreia, impotência, úlceras e supressão imunológica (SAPOLSKY, 2000).

Estudos mostram que o estresse crônico produz ansiedade em ratos, condição acompanhada pelo decréscimo na atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATP/ases e superóxido dismutases na amígdala (BONDI et al., 2008; CREMA et al., 2010). O estresse crônico também provoca prejuízos na atividade locomotora (KATZ; ROTH; CARROL, 1981; D'AQUILA et al., 2000) e alterações no comportamento alimentar de ratos, aumentando ou diminuindo a preferência destes por alimentos doces, conforme o modelo de estresse utilizado. Pesquisadores observaram que o estresse crônico por imobilização aumenta o consumo de alimentos doces (ELY et al., 1997; SILVEIRA et al., 2000; PETTENUZZO et al., 2008) e provoca alterações serotoninérgicas e dopaminérgicas corticais, hipocampais, hipotalâmicas e amigdalares (TORRES et al., 2002) enquanto que o estresse crônico variado promove diminuição da preferência por alimentos doces (GAMARO et al., 2003a, 2003b), uma expressão da anedonia, sintoma clássico da depressão maior em humanos (BANERJEE et al., 2012). A diminuição no consumo de alimentos doces é acompanhada por alterações no sistema dopaminérgico hipotalâmico, cortical e hipocampal (GAMARO et al., 2003a) e pela redução na atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATPases hipocampais (GAMARO et al., 2003b).

A L-arginina é um aminoácido cujas funções vão além da síntese de proteínas. Esta molécula também está envolvida em diversas vias metabólicas que produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos, como agmatina, glutamato, poliaminas, ornitina e citrulina (CAMPBELL; BOUNTY; ROBERTS, 2004) e na secreção de hormônios (somatotrofina, prolactina, insulina, glucagon,

somatostatina e catecolaminas) (SUCHNER; HEYLAND; PETER, 2002). Contudo, parece provável que o destino metabólico mais estudado da L-arginina seja a produção do gás óxido nítrico (NO) (BÖGER et al., 2007), que apresenta diversas funções ao nível do sistema nervoso, participando da formação da memória, percepção da dor, controle do sono, apetite, termorregulação, liberação de neurotransmissores, desenvolvimento e sobrevivência neuronal (GUIX et al., 2005), comportamento alimentar (MORLEY, et al., 1991; STRICKER-KRONGRAD; BECK; BURLET, 1996), adaptação e susceptibilidade ao estresse psicológico (GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006) e aos problemas relacionados com esta condição, como depressão (ZHOU et al., 2007; HUA et al., 2008) e ansiedade (MASSOD et al., 2003; GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006).

A L-arginina também participa da síntese de creatina, um composto guanidínico particularmente envolvido no metabolismo energético que também possui propriedades antioxidantes (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006; YOUNG et al., 2010). Estudos mostram que a creatina também pode funcionar como neuroprotetora em diversos modelos de distúrbios neurológicos, especialmente aqueles que envolvem prejuízos no metabolismo energético e estresse oxidativo, como as doenças neurodegenerativas (MATTHEWS et al., 1999; FERRANTE et al., 2000; BÜRKLEN et al., 2006), doenças neurológicas agudas (SULLIVAN et al., 2000; PRASS et al., 2007), doenças neuromusculares e neurometabólicas (TARNOPOLSKY, 2007), doenças vinculadas a erros inatos do metabolismo (ANDRES et al., 2008), distúrbios psiquiátricos (AMITAL et al., 2006a; AMITAL et al., 2006b; CUNHA et al., 2012) e alterações cognitivo-comportamentais vinculadas ao estresse psicológico (KOGA et al. 2005, McMORRIS et al., 2006, 2007a). Há fortes evidências de que a suplementação com creatina pode desempenhar um papel crítico em uma gama de funções cognitivas, incluindo memória, atenção, linguagem e emoções (ALLEN, 2012), e estudos recentes vêm apontando relações desta substância com o comportamento alimentar de ratos (GALBRAITH; FURUKAWA; LI, 2006).

Levando em consideração o contexto apresentado, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS EXPERIMENTAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 34 ratos *Wistar* adultos (~120 dias no início dos experimentos) com peso médio de aproximadamente 374 gramas. Com exceção às atividades de estresse e tarefas comportamentais, os animais permaneceram em suas caixas-moradias em um ambiente com condições controladas de temperatura ($26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com acesso à água e ração da marca PURINA[®] *ad libitum* (exceto os animais sob estresse no período em que o estressor aplicado foi privação de alimento). Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais constituídos de 7 animais cada um: controle (Ct), estresse crônico (Ec), estresse crônico + L-arginina, (Ec/La), estresse crônico + creatina (Ec/Cr) estresse crônico + L-arginina + creatina (Ec/La+Cr).

O tratamento ocorreu por meio da técnica de gavagem, durante todo o experimento (estresse + tarefas comportamentais). Buscou-se evitar qualquer forma de estresse nos animais do grupo Ct, por isso optou-se por não utilizar o procedimento de gavagem nestes animais. Os reagentes foram administrados nas seguintes dosagens:

- Grupo Ec: solução de 1ml contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/La: solução de 1ml composta por 500mg/Kg de L-arginina + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/Cr: solução de 1ml contendo 300mg/Kg de creatina monohidratada + 0,5% de CMC e água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/La+Cr: solução de 1,5ml contendo 500mg/Kg de L-arginina + 300mg/Kg de creatina monohidratada + 0,5% de CMC e água purificada q.s.p.

MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

Utilizou-se um modelo de estresse crônico variado adaptado de Gamaro et al. (2003a, 2003b) e Vasconcellos et al. (2003, 2005). A exposição ao estresse aconteceu durante 40 dias, período necessário para que os níveis de corticosterona se elevem em aproximadamente 90% (VASCONCELLOS et al., 2005). Os animais

do grupo Ct permaneceram em suas caixas-moradias durante todo o período de estresse, recebendo somente cuidados diários comuns, como troca de maravalha, água e ração.

Os estressores utilizados foram: ambiente congestionado (7 animais por caixa-moradia durante 24h), exposição ao frio (1h), imobilização (1-2h), inclinação das caixas-moradias em um ângulo aproximado de 45° (2-4h), luz intermitente (1-2h), privação de alimento (24h) e ruído (15-40min). Aplicou-se diariamente e aleatoriamente 1 entre estes 7 estressores, em períodos e horários diferentes na tentativa de minimizar a previsibilidade do animal em relação ao estressor (VASCONCELLOS et al., 2005).

O estresse por inclinação da caixa-moradia ocorreu através da inserção de um tijolo abaixo da mesma. Para a realização da exposição ao frio, utilizou-se uma caixa de isopor de 80 litros ventilada com a temperatura aproximada de 5–7°C controlada por dois termômetros da marca INCOTERM®. Na atividade de imobilização, os animais foram inseridos no interior de garrafas *Pet de Coca Cola*® de 600 ml, ficando impossibilitados de se locomover, porém livres para a realização dos movimentos respiratórios necessários. O ruído foi realizado por meio de 3 alarmes magnéticos de 90db cada, fixados nas paredes do ambiente em que os animais eram mantidos. Para a exposição ao estressor “luz intermitente” as caixas-moradias foram agrupadas em um ambiente ausente de iluminação contendo 4 lâmpadas “pisca-pisca” de 15 watts cada.

CONSUMO DE RAÇÃO, INGESTÃO DE ÁGUA E PESO CORPORAL

Durante o período de estresse, o consumo de ração e a ingestão de água foram mensurados e expressos em g/100g e ml/100g, respectivamente. As medidas foram realizadas diariamente, sempre no mesmo horário (14 horas). Optou-se por desconsiderar os dados referentes aos dias em que o estressor “privação de alimento” foi aplicado, bem como aqueles do dia imediatamente posterior (GAMARO et al., 2003a). Para calcular o consumo semanal de água e ração por animal, realizou-se a média semanal do consumo por caixa e dividiu-se pelo número de animais presentes na mesma. Em seguida, a medida obtida foi dividida pelo peso do animal.

O peso corporal foi aferido semanalmente durante todo o período de estresse. No final dos experimentos (estresse + tarefas comportamentais), obteve-se o peso corporal dos animais para determinar o índice de Lee por meio da seguinte fórmula:

Figura 1 – Fórmula para o cálculo do índice de Lee.

$$\frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{comprimento naso-anal (cm)}}$$

Fonte: **Adaptado de** MOURA, R. F. et al. Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Rev Bras Med Esporte**, v.14, n.5, 2008.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Labirinto em cruz elevado

É um equipamento desenvolvido por Pellow et al. (1985) para avaliar a ansiedade em roedores. Neste estudo, utilizou-se um equipamento constituído de madeira, mantido a 50 cm do chão e composto por 4 braços, sendo 2 abertos (BAs) e 2 fechados (BFs), medindo 50 x 10 cm cada e uma arena central de 10 x 10 cm no cruzamento entre os braços. No 41º dia de experimento, cada animal foi colocado na arena central com a cabeça voltada para um dos BFs e deixado explorar o equipamento por um período de 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram mensurados: (a) número de entradas e tempo de permanência em BAs (b) número de entradas e tempo de permanência em BFs (c) porcentagem (%) de entradas em BAs (entradas nos BAs / [entradas nos BAs + entradas nos BFs] x 100) e (d) porcentagem (%) de tempo transcorrido nos BAs (tempo no BAs / [tempo no BAs + tempo no BFs] x 100) (MASOOD et al., 2003).

Campo aberto

A análise da atividade locomotora foi realizada por meio da tarefa de campo aberto. Consiste de uma caixa de madeira medindo 50 x 40 x 60 cm, com frente de vidro que permite a visualização do comportamento do animal. O assoalho desta caixa é dividido em 12 quadrantes iguais medindo 15 x 13,3 cm cada. No 42º dia de experimento, cada animal foi gentilmente colocado neste equipamento, com a face

virada para um dos vértices do piso e deixado explorar por um período de 5 minutos. O número de quadrantes percorridos foi utilizado como medida da atividade locomotora do animal.

Tarefa de comportamento alimentar

É um procedimento utilizado por Gamaro et al. (2003a) e baseia-se no princípio de os animais cronicamente estressados demonstram uma diminuição na preferência por alimentos açucarados, uma expressão da anedonia, sintoma de clássico da depressão maior em humanos (BANERJEE et al., 2012).

Esta tarefa iniciou-se no 43º dia de experimento. Inicialmente os animais foram habituados em um novo ambiente contendo alimentos doces, isto é, foram colocados na extremidade de uma caixa de madeira retangular com vidro no teto, nas medidas de 40 x 15 x 20 cm, contendo 10 *pellets* do cereal Froot Loops® (roscas de trigo, amido e sacarose) da marca *Kellongs*®. Os animais passaram por uma sessão diária de 3 minutos durante 5 dias consecutivos (43º, 44º, 45º, 46º e 47º dias de experimento) para habituação ao equipamento, sob restrição alimentar todos os dias (80% da ração ingerida no 42º dia de experimento). No 48º dia de experimento, realizou-se uma sessão de teste, também por um período de 3 minutos, porém com os animais alimentados *ad libitum*. Tanto nas sessões de habituação quanto na sessão de teste avaliaram-se os seguintes parâmetros: (a) latência para iniciar o consumo de Froot Loops® (b) quantidade de Froot Loops® consumido. Para evitar o viés da observação, a contagem foi realizada sempre pela mesma pessoa.

PARÂMETROS ANATÔMICOS E BIOQUÍMICOS

No dia posterior à última sessão de teste comportamental, os animais foram sacrificados mediante decapitação, o sangue troncular foi coletado para a análise dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos, que foram determinados pelo método enzimático e calorímetro (reação de Trinder), utilizando o Kit comercial LABTEST®. Os resultados foram expressos em mg/dl.

Mensurou-se também o peso do tecido adiposo (gordura das regiões mesentérica, retroperitoneal e periepididimal), fígado e rim esquerdo. Os dados foram expressos em g de tecido por 100 g de peso corporal (g/100g).

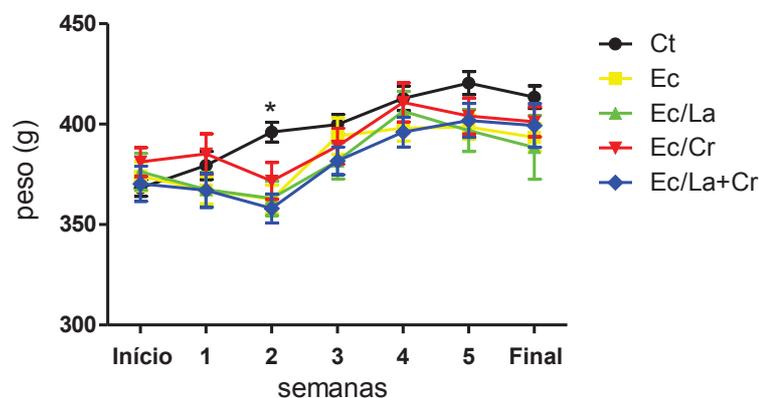
ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA de medidas repetidas para o cálculo do ganho de peso, consumo de ração e ingestão de água durante o período de estresse. Optou-se por ANOVA de uma via para os demais parâmetros. Ambos os testes foram seguidos do *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK). Em todos os casos os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao peso inicial dos animais (Ct: $368,1 \pm 4,07$; Ec: $374 \pm 7,3$; Ec/La: $376,0 \pm 9,128$; Ec/Cr: $381,1 \pm 7,15$; Ec/La+Cr: $371,1 \pm 7,43$ - ANOVA de uma via/SNK, $F(4,30) = 0,47$, $P = 0,75$, $n=7$). Em relação ao ganho de peso semanal, observou-se que apenas na segunda semana de estresse os animais mostraram diferenças significativas. Os animais do grupo Ct apresentaram mais de 8% de peso comparado aos animais dos demais grupos (Ct: $396,0 \pm 4,9$; Ec: $362,6 \pm 7,03$; Ec/La: $363,0 \pm 8,61$; Ec/Cr: $371,7 \pm 9,19$; Ec/La+Cr: $358,0 \pm 7,13$ - ANOVA de uma via/SNK, $F(4,29) = 4,07$, $P < 0,05$, $n=7-6$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Ganho de peso semanal durante o período de estresse.



Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. Estes valores representam o peso semanal dos animais em g desde o início do período de estresse até o final (40 dias). O símbolo acima da barra indica as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

Em relação ao ganho de peso durante todo o período de estresse, percebeu-se que os animais do grupo Ct ganharam aproximadamente 4% de peso corporal em relação aos grupos Ec, Ec/La e Ec/La+Cr (Ct: 398,6±7,24; Ec: 384,0±5,86; Ec/La: 382,9±5,89; Ec/Cr: 391,9±5,27; Ec/La+Cr: 382,0±6,59 - ANOVA de medidas repetidas/SNK, $F(4,24) = 8,04$, $P < 0,05$, $n=7-6$).

ÍNDICE DE LEE E PESO RELATIVO DO TECIDO ADIPOSEO

O Índice de Lee não se alterou entre os grupos ($F(4,29) = 1,25$, $P = 0,30$). Contudo, percebeu-se que os grupos Ec, Ec/La e Ec/Cr apresentaram redução significativa no peso relativo do tecido adiposo em relação ao grupo Ec/La+Cr, nas proporções de 25%, 30% e 25%, respectivamente ($F(4,27) = 3,65$, $P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Índice de Lee (Lee) e peso relativo do tecido adiposo (PTA)

Parâmetro	Ct	Ec	Ec/La	Ec/Cr	Ec/La+Cr
Lee	0,31±0,00	0,30±0,00	0,31±0,00	0,29±0,01	0,31±0,00
PTA	3,71±0,33	3,24±0,24 ^e	3,00±0,22 ^e	3,23±0,21 ^e	4,30±0,33

Os dados estão expressos em média ± E.P.M. O índice de Lee foi calculado mediante a fórmula apresentada na sessão de materiais e métodos. O peso relativo do tecido adiposo está representado em g de tecido por 100 g de peso corporal (g/100g). Os símbolos acima dos números indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

CONSUMO DE RAÇÃO

O consumo de ração foi mensurado diariamente durante todo o período de estresse. A Tabela 2 mostra que a partir da 2ª semana de estresse os animais de todos os grupos consumiram maior quantidade de ração que os animais do grupo Ct.

Tabela 2 – Consumo semanal de ração durante o período de estresse (g/100g)

Semana	Ct	Ec	Ec/La	Ec/Cr	Ec/La+Cr
1	5,75±0,05	6,13±0,12	6,00±0,14	6,00±0,13	6,00±0,21
2	6,18±0,10	7,42±0,15 ^a	7,04±0,18 ^a	7,31±0,17 ^a	7,21±0,24 ^a
3	5,72±0,06	7,04±0,14 ^a	6,95±0,21 ^a	6,64±0,22 ^a	7,13±0,24 ^a
4	5,78±0,08	6,59±0,13 ^a	6,66±0,19 ^a	6,57±0,15 ^a	7,07±0,14 ^a
5	5,77±0,08	6,18±0,10 ^a	6,42±0,17 ^a	6,41±0,16 ^a	6,70±0,16 ^a
6	5,28±0,09	6,77±0,07 ^a	6,49±0,22 ^a	6,26±0,13 ^a	6,70±0,15 ^a

Os dados estão expressos em média ± E.P.M. Estes valores referem-se ao consumo semanal de ração durante o período de estresse, e estão representados em g de ração por 100g de peso corporal (g/100g), conforme informações contidas na sessão de materiais e métodos. Os símbolos acima dos números indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

Considerando os dados referentes ao consumo de ração durante todo o período de estresse, percebeu-se que os animais do grupo Ct apresentaram um consumo em torno de 16% menor que os demais grupos (Ct: $5,75 \pm 0,12$; Ec: $6,70 \pm 0,21$; Ec/La: $6,60 \pm 0,15$; Ec/Cr: $6,51 \pm 0,19$; Ec/La+Cr: $6,83 \pm 0,18$ - ANOVA de medidas repetidas/SNK, $F(4,20) = 18,98$, $P < 0,05$, $n=7-6$).

INGESTÃO DE ÁGUA

A ingestão de água também foi mensurada diariamente durante todo o período de estresse. Neste parâmetro, verificaram-se diferenças significativas entre os grupos desde a primeira semana de estresse. De forma geral, todos os grupos ingeriram mais água que os animais do grupo Ct (Tabela 3).

Tabela 3 – Ingestão semanal de água durante o período de estresse (ml/100g)

Semana	Ct	Ec	Ec/La	Ec/Cr	Ec/La+Cr
1	$13,27 \pm 0,14$	$16,15 \pm 0,51^{a,c}$	$14,41 \pm 0,34^a$	$16,67 \pm 0,32^{a,c}$	$17,07 \pm 0,43^{a,c}$
2	$13,74 \pm 0,23$	$15,93 \pm 0,64^a$	$16,55 \pm 0,36^a$	$17,32 \pm 0,63^a$	$16,06 \pm 0,74^a$
3	$13,04 \pm 0,39$	$14,11 \pm 0,34$	$15,25 \pm 0,36^a$	$15,35 \pm 0,78^a$	$15,69 \pm 0,30^a$
4	$13,41 \pm 0,34$	$14,63 \pm 0,56$	$16,02 \pm 0,37^a$	$15,67 \pm 0,38^a$	$17,67 \pm 0,65^{a,b,d}$
5	$12,95 \pm 0,31$	$14,43 \pm 0,27^a$	$15,23 \pm 0,37^a$	$14,93 \pm 0,35^a$	$16,81 \pm 0,33^{a,b,c,d}$
6	$11,51 \pm 0,26$	$15,72 \pm 0,26^a$	$17,14 \pm 0,70^a$	$17,54 \pm 0,39^{a,b}$	$16,71 \pm 0,50^a$

Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. Estes valores referem-se à ingestão semanal de água durante o período de estresse, e estão representados em ml de água por 100g de peso corporal (ml/100g), conforme informações contidas na sessão de materiais e métodos. Os símbolos acima dos números indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

Considerando os dados da ingestão de água durante todo o período de estresse, os resultados mostraram que os animais do grupo Ct ingeriram significativamente menor quantidade de água que os demais grupos, em torno de 17% em relação ao grupo Ec, 21% comparado ao grupo Ec/La, 25% em relação ao grupo Ec/Cr e 28% comparado ao grupo Ec/La+Cr (Ct: $12,99 \pm 0,32$; Ec: $15,16 \pm 0,35$; Ec/La: $15,77 \pm 0,41$; Ec/Cr: $16,25 \pm 0,44$; Ec/La+Cr: $16,67 \pm 0,29$ – ANOVA de medidas repetidas/SNK, $(F(4,20) = 17,54$, $P < 0,05$, $n=7-6$).

PESO RELATIVO DO FÍGADO E DO RIM ESQUERDO

Não foram encontradas diferenças significativas referentes ao peso relativo do rim esquerdo dos animais ($F(4,29) = 1,91$, $P = 0,13$). Contudo, verificou-se que os

animais do grupo Ct apresentaram o peso relativo do fígado em torno de 7% maior que os animais dos grupos Ec, Ec/La e Ec/La+Cr ($F(4,24) = 3,79$, $P < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Peso relativo do fígado e rim esquerdo (g/100g)

Órgão	Ct	Ec	Ec/La	Ec/Cr	Ec/La+Cr
Fígado	2,54±0,02	2,38±0,04 ^a	2,36±0,05 ^a	2,45±0,05	2,32±0,04 ^a
Rim	0,29±0,00	0,30±0,01	0,27±0,00	0,29±0,00	0,27±0,00

Os dados estão expressos em média ± E.P.M. O peso relativo do fígado e rim esquerdo estão representados em g de tecido por 100g de peso corporal (g/100g). Os símbolos acima dos números indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: glicose (GLI), colesterol total (COL) e triglicerídeos (TRI). Os níveis de colesterol ($F(4,24) = 1,72$, $P = 0,17$) e triglicerídeos ($F(4,24) = 0,69$, $P = 0,60$) não se alteraram entre os grupos. Em relação aos níveis de glicose, observou-se que os animais do grupo Ct apresentaram níveis plasmáticos desta significativamente menores que os demais grupos, aproximadamente 15% em relação ao grupo Ec e 21% comparado aos demais grupos ($F(4,24) = 3,65$, $P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos: GLI (glicose), COL (colesterol total) e TRI (triglicerídeos).

Parâmetro	Ct	Ec	Ec/La	Ec/Cr	Ec/La+Cr
GLI	76,50±5,7	88,17±3,5 ^a	94,67±2,7 ^a	91,67±2,3 ^a	92,20±3,4 ^a
COL	89,00±2,4	101,7±3,7	100,3±4,5	93,67±4,9	98,20±4,0
TRI	97,50±4,4	102,5±5,5	103,3±3,1	102,0±2,8	107,2±3,6

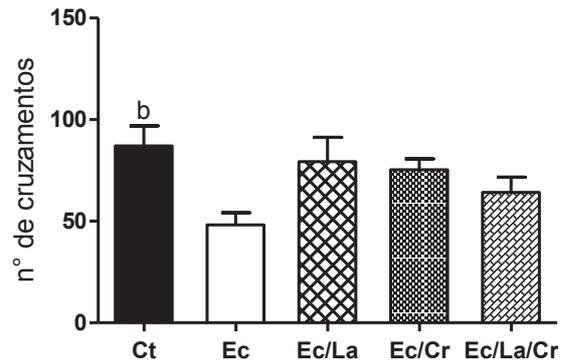
Os dados estão expressos em média ± E.P.M. Os níveis plasmáticos destas substâncias estão representados em mg/dl. Os símbolos acima dos números indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Campo aberto

Os animais do grupo Ec tiveram uma redução significativa na atividade locomotora, apresentando o número de cruzamentos entre os quadrantes aproximadamente 80% menor que os animais do grupo Ct ($F(4,24) = 3,13$, $P < 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Número de cruzamentos entre os quadrantes

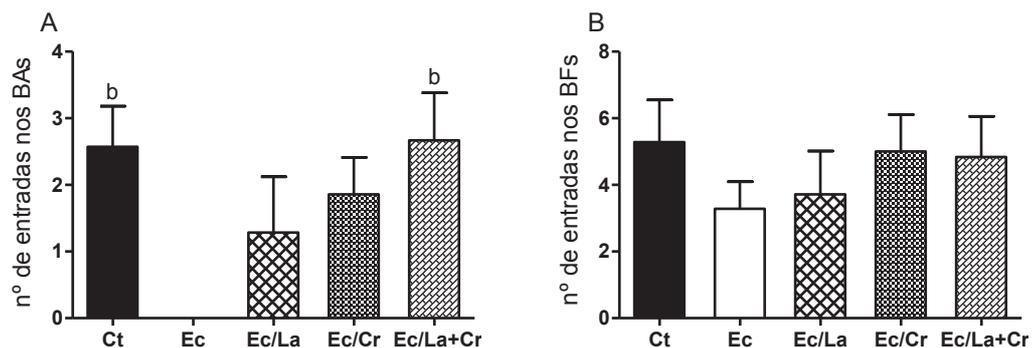


Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam o número de cruzamentos entre os quadrantes na tarefa de campo aberto. Os símbolos acima das barras indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n = 7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

Labirinto em cruz elevado

O estresse crônico provocou uma diminuição significativa no número de entradas nos BAs. Este efeito foi revertido pela coadministração de L-arginina e creatina ($F(4,29) = 3,21$, $P < 0,05$). Observou-se uma forte tendência de diferença entre os grupos quanto ao número de entradas nos BFs ($F(4,29) = 0,58$, $P = 0,68$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Número de entradas nos BAs (A) e nos BFs (B).

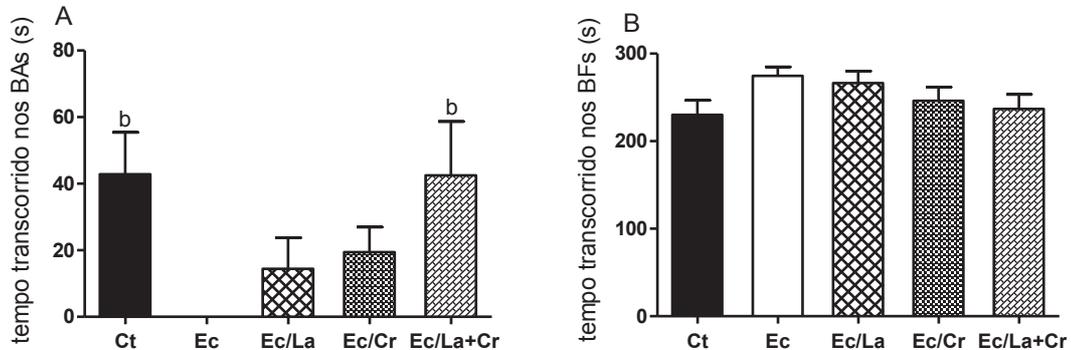


Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam o número de entradas nos BAs e BFs do labirinto em cruz elevado. Os símbolos acima das barras indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n = 7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

Verificou-se também que o estresse crônico provocou uma redução do tempo transcorrido nos BAs. Este efeito também foi revertido somente pela coadministração de L-arginina e creatina ($F(4,29) = 3,29$, $P < 0,05$). Não foram observados efeitos do

estresse e dos tratamentos quanto ao tempo transcorrido nos BFs ($F(4,29) = 1,71$, $P = 0,17$) (Gráfico 4).

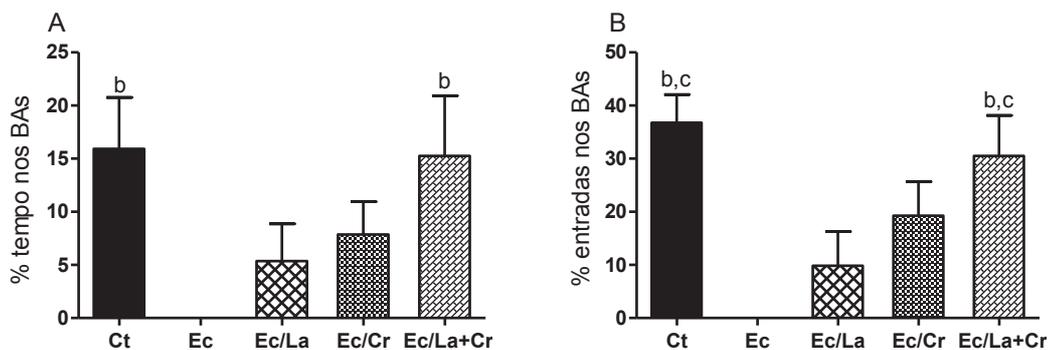
Gráfico 4 – Tempo transcorrido nos BAs (A) e nos BFs (B).



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam o (A) tempo transcorrido nos BAs e (B) BFs do labirinto em cruz elevado. Os símbolos acima das barras indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

O estresse crônico também diminuiu a porcentagem (%) de tempo e porcentagem (%) de entradas nos BAs. Os resultados mostraram que ambos os efeitos do estresse foram revertidos pela coadministração de L-arginina e creatina ($F(4,29) = 3,13$, $P < 0,05$) (Gráfico 5A) e ($F(4,29) = 6,98$, $P < 0,05$) (Gráfico 5B).

Gráfico 5 – Porcentagem de tempo transcorrido nos BAs (A) e porcentagem de entradas nos BAs (B).

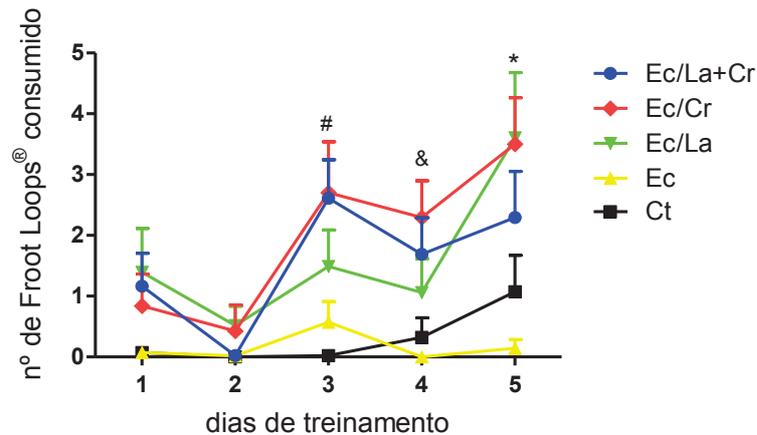


Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam (A) % tempo transcorrido nos BAs e (B) % entradas nos BAs, calculados a partir da fórmula indicada na sessão de materiais e métodos. Os símbolos acima das barras indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

Tarefa de comportamento alimentar

Nos 1º e 2º dias de treinamento (habituação) não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto ao consumo de Froot Loops®. Entretanto, a partir do 3º dia, diferenças estatísticas foram observadas (Gráfico 6).

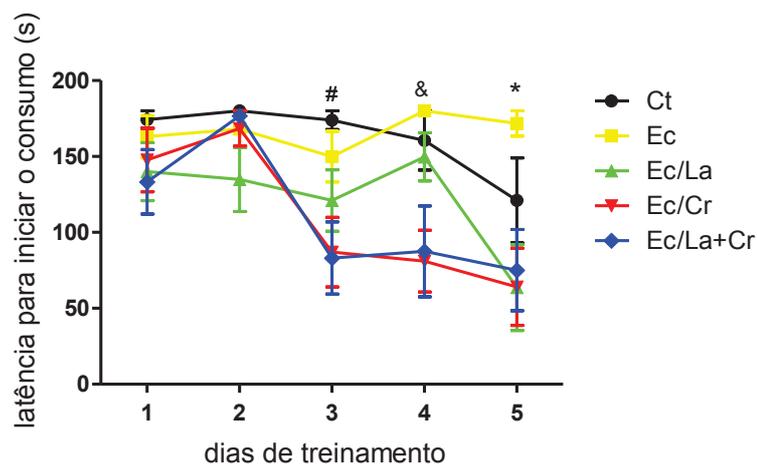
Gráfico 6 – Consumo de Froot Loops® durante as sessões de treinamento.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam o consumo de Froot Loops® durante as cinco sessões de treinamento (habituação). Os símbolos (#, &, *) indicam que foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, usando ANOVA de uma via/SNK, $p < 0,05$, $n = 7-6$ animais/grupo. [#Ec/Cr e Ec/La+Cr > Ct e Ec ($F(4,29) = 4,57$, $P < 0,05$); &Ec/Cr > Ec ($F(4,33) = 2,83$, $P < 0,05$); *Ec/La e Ec/Cr > Ec ($F(4,35) = 4,05$, $P < 0,05$)].

Os grupos também não apresentaram diferenças em relação à latência para iniciar o consumo de Froot Loops® nos 1º e 2º dia de treinamento. Entretanto, a partir do 3º dia, diferenças estatísticas foram observadas (Gráfico 7).

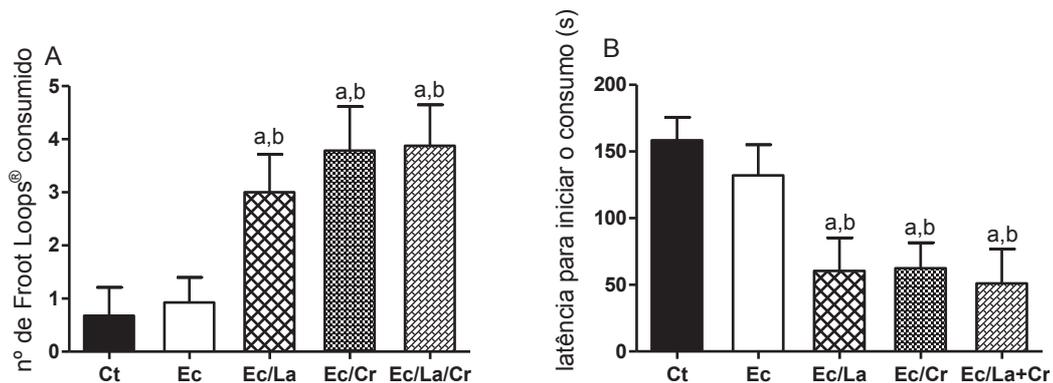
Gráfico 7 – Latência para iniciar o consumo de Froot Loops® durante as sessões de treinamento.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam a latência para iniciar o consumo de Froot Loops® durante as cinco sessões de treinamento (habituação). Os símbolos (#, &, *) indicam que foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos conforme ANOVA de uma via/SNK, $p < 0,05$, $n = 7-6$ animais/grupo. [#Ct > Ec/Cr e Ec/La+Cr, ($F(4,29) = 4,35$, $P < 0,05$); &Ct, Ec e Ec/La > Ec/Cr e Ec/La/Cr, ($F(4,29) = 5,54$, $P < 0,05$); *Ec > Ec/La, Ec/Cr e Ec/La/Cr, ($F(4,29) = 3,75$, $P < 0,05$)].

No dia de teste, os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos quanto ao número de Froot Loops[®] consumido e latência para iniciar o consumo destes. Os animais dos grupos Ec/La, Ec/Cr e Ec/La+Cr consumiram maior quantidade de Froot Loops[®] ($F(4,29) = 5,27$, $P < 0,05$) (Gráfico 8A) e apresentaram menores latências para iniciar o consumo destes ($F(4,29) = 4,93$, $P < 0,05$) (Gráfico 8B) em comparação aos animais dos grupos Ct e Ec.

Gráfico 8 – (A) Número de Froot Loops[®] consumido (B) latência para iniciar o consumo (sessão de teste).



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam (A) o número de Froot Loops[®] consumido (B) latência para iniciar o consumo destes na sessão de teste. Os símbolos acima das barras indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n = 7-6$ animais/grupo (a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os animais do grupo Ec ganharam menos peso corporal que os animais do grupo Ct. O menor ganho de peso corporal pode estar vinculado com a privação de água e alimento que compõe o modelo de estresse crônico (WILLNER, 1997). No entanto, estudos mostram que os animais submetidos ao estresse crônico ganham menos peso corporal mesmo sem a inclusão da privação de água e alimento no modelo de estresse (LUCCA et al., 2008; BANERJEE et al., 2012) ou com a utilização destes estressores (GAMARO et al., 2003a, 2003b; PETTENUZZO et al., 2008). Desta forma, neste estudo, parece provável que o menor ganho de peso corporal esteja relacionado com a combinação de estímulos aversivos e a privação intermitente de água e alimento que compõe o modelo de estresse (CARDOSO e BANACO, 2009). O menor ganho de peso corporal em animais estressados também tem sido relacionado à ação de

glicocorticóides, que mobilizam estoques de energia e aumentam gliconeogênese hepática (TORRES et al., 2007; PETTENUZZO et al., 2008).

Mesmo perdendo peso relativo do tecido adiposo, os animais do grupo Ec/Cr foram os únicos a apresentar o peso corporal estatisticamente semelhante aos animais do grupo Ct. Estudos mostram que a suplementação com creatina aumenta o peso corporal, e este fator pode estar relacionado com o poder desta substância em aumentar a retenção de água no interior das células (ALLEN, 2012). A suplementação com creatina também pode aumentar o peso corporal sem afetar a ingestão calórica e o percentual de gordura (KUTZ; GUNTER, 2003) e pode aumentar o percentual de proteína muscular independente do treinamento (FRANCO et al., 2007).

Por outro lado, percebeu-se que os animais que receberam creatina e L-arginina (grupo Ec/La+Cr), mesmo apresentando o maior percentual de gordura entre os grupos, não ganharam peso corporal de maneira semelhante aos tratados isoladamente com creatina (grupo Ec/Cr). É provável que a L-arginina tenha atuado como um elemento bloqueador para o ganho de peso nestes animais.

A L-arginina aumenta a secreção do hormônio do crescimento (GH) pela hipófise anterior (CAMPBELL; LA BOUNTY; ROBERTS, 2004), e este hormônio apresenta funções lipolíticas, estimulando a lipólise por meio da oxidação de ácidos graxos do tecido adiposo durante restrição calórica e exercício físico, promovendo assim alterações no peso corporal (CHIYODA et al., 2009). Entretanto, neste estudo, é mais provável que os animais tratados com L-arginina e creatina (grupo Ec/La+Cr) perderam proteína muscular devido a ação do NO. Estudos mostram que doadores de NO podem acelerar a proteólise em músculos esqueléticos em até 80% (TAWA; WARREN, 1997).

Os resultados mostraram que os animais dos grupos Ec, Ec/La e Ec/Cr apresentaram o peso relativo do tecido adiposo estatisticamente inferior aos animais do grupo Ec/La+Cr, os quais apresentaram este parâmetro semelhante aos animais do grupo Ct. As catecolaminas, o hormônio do crescimento e os glicocorticóides são os principais responsáveis por estimular a lipólise, enquanto que a insulina estimula a lipogênese (PRESTES et al., 2006). Entretanto, o efeito “lipolítico” dos GCs são anulados nas situações em que seus níveis plasmáticos estão muito elevados, como no estresse crônico, em que os glicocorticóides contribuem para o aumento da adiposidade visceral (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011).

Pesquisas envolvendo a coadministração de L-arginina e creatina são bastante raras, porém algumas questões importantes precisam ser consideradas em relação à suplementação com estas substâncias. A literatura aponta que a formação de NO reflete apenas a minoria do fluxo da L-arginina (~1%), sendo que a grande proporção deste aminoácido participa da biossíntese de creatina (JAHANDIR et al., 2009). Contudo, estudos mostram que a síntese de guanidinoacetato (GAA) catalisada pela enzima arginina: glicina amidinotransferase (AGAT), é um passo limitante na biossíntese de creatina a partir da L-arginina. Existe um mecanismo de regulação por *feedback* negativo exercido pela própria creatina na AGAT, permitindo assim o aumento da disponibilidade da L-arginina para outras vias metabólicas, como para a síntese de NO (JAHANGIR et al., 2009; HAINES; PENDLETON; EICHLER, 2011).

Levando em consideração as informações acima, neste estudo, parece plausível supor que a coadministração de L-arginina e creatina aumentou a biodisponibilidade tanto de creatina quanto de NO. Assim, é possível que a maior quantidade de NO tenha contribuído para prevenir os efeitos dos glicocorticóides e catecolaminas na diminuição do peso relativo do tecido adiposo nos animais do grupo Ec/La+Cr. O NO é uma molécula capaz de reduzir a atividade simpática adrenal (LECHIN et al., 2006) e a síntese e concentração plasmática de corticosterona (GIORDDANO et al, 1996; CYMERYNG; DADA; PODESTÁ, 1998, CYMERYNG et al., 1999).

Os níveis plasmáticos de glicose mostraram-se significativamente aumentados em todos os grupos de animais submetidos ao modelo de estresse crônico. A elevação dos níveis de glicose pode ser considerado um marcador metabólico fidedigno do estado de estresse e ansiedade (MELLO et al., 2007). Em situações de estresse, pode ocorrer um aumento do suplemento energético graças à liberação de catecolaminas e glicocorticóides que, em geral, aumentam a gliconeogênese e glicogenólise e inibem a captação de glicose (PACÁK; PALKOVITS, 2001), ações responsáveis pelo aumento da glicemia.

Neste estudo, percebeu-se que os animais dos grupos Ec, Ec/La e Ec/La+Cr apresentaram o peso do fígado estatisticamente inferior aos animais do grupo Ct, evidenciando um aspecto importante da efetividade do modelo de estresse, conforme os achados de Hans Selye (SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2012). Em estado de estresse crônico, os glicocorticóides produzem uma marcante redução do

volume hepático (SELYE; FORTIER, 1950). Somente a administração isolada com creatina preveniu a perda de peso do fígado dos animais, porém os mecanismos fisiológicos envolvidos neste fenômeno ainda precisam ser elucidados.

Os animais estressados de todos os grupos consumiram significativamente mais ração e água que os animais controle. Vale ressaltar que neste estudo, para o cálculo do consumo de ração e ingestão de água, desconsiderou-se os dados referentes ao dia em que o estressor “privação de alimento” foi administrado, bem como os dados do dia imediatamente posterior (GAMARO et al., 2003a). Esta conduta teve por objetivo evitar os possíveis efeitos do “comportamento compulsivo alimentar” ou *binge*, pois quando os animais são expostos a um estressor intenso após um período de privação de alimento, apresentam um aumento significativo no consumo de ração (BOGGIANO et al., 2007).

A relação entre estresse e consumo alimentar é bastante complexa e controversa. Os hormônios do estresse desempenham um papel importante no apetite, podendo aumentar ou diminuir a ingestão de alimentos, contribuindo para a obesidade ou anorexia (GEORGE et al., 2010). Estudos com humanos e animais demonstraram que o aumento ou diminuição do consumo de alimentos em resposta ao estresse depende das características do estressor (espécie, intensidade e duração), aspectos individuais do organismo, assim como o estado metabólico ou restrição dietética (GREENO; WING, 1994). Levando em consideração as características dos estressores, investigações apontam que estressores severos parecem levar a um decréscimo no consumo de ração, enquanto que estressores moderados, em alguns casos, promovem o aumento ou não representam nenhum efeito (TORRES; NOWSON, 2007).

A infusão do neuropeptídeo CRH e o consequente aumento dos níveis de cortisol estimulam o consumo de alimento em humanos (GEORGE et al., 2010). Em situações de estresse, os glicocorticóides além de estimularem o consumo de alimentos, podem levar humanos e roedores à preferência de alimentos de alto valor calórico. As catecolaminas também aumentam o consumo alimentar quando injetadas no cérebro de roedores (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011).

Os glicocorticóides também podem afetar o apetite de maneira indireta através de outros hormônios e neurotransmissores, como o neuropeptídeo orexígeno Y (NPY). O NPY contribui para aumentar o apetite (TORRES; NOWSON, 2007; PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011). Em estado de estresse intenso e/ou

prolongado, o NPY é liberado preferencialmente dos nervos simpáticos e pode exercer efeitos sinérgicos com a noradrenalina ou efeitos singulares, atuando principalmente como estimulador das estruturas centrais vinculadas ao apetite (KUO et al., 2008).

Em situações de estresse agudo, os glicocorticóides são antagonizados pela ação da insulina e leptina, porém no estresse crônico, este sistema de equilíbrio é desregulado, possivelmente contribuindo para um aumento no consumo de alimento e acúmulo de gordura visceral (ADAM; EPEL, 2007).

Interessantemente, percebeu-se que os animais estressados de todos os grupos consumiram maior quantidade de ração que os controles, porém ganharam menos peso que os mesmos. Este fator pode estar relacionado às alterações tireoidianas provocadas pelo estresse. Estudos mostram que pequenas alterações nos níveis de glicocorticóides podem alterar o funcionamento da tireóide (KELLY, 2000).

O estresse pode levar ao decréscimo dos hormônios T3, T4 e TSH circulantes, porém não exerce efeitos importantes nos T3 reversos (HELMREICH; TYLEE, 2011). Contrariamente, pesquisadores mostraram que diversas formas de estresse (fisiológico, químico ou psicológico) podem induzir o aumento dos hormônios T3 e T4 e o decréscimo de TSH (KALE; BHUSARI; UMATHE, 2011). Estas alterações estão presentes no hipertireoidismo, uma condição patológica caracterizada pela hipersecreção dos hormônios tireoidianos que provoca aumento da taxa metabólica e elevação da produção de calor, e sintomas como ingestão alimentar elevada acompanhada da perda de peso corporal (TORTORA; GRABOWSKI, 2006).

O aumento da ingestão de água por ratos e camundongos em estresse crônico tem sido mostrada em estudos anteriores. Pesquisadores acreditam que isto pode estar associado a um quadro de polidipsia (sede excessiva) induzida pelo estresse, aumento das necessidades metabólicas, *diabetes mellitus* e secreção hormonal alterada no hipotálamo e hipófise (STREKALOVA et al. 2011).

O estado de anedonia provocado pelo estresse crônico está associado ao consumo elevado de água. A administração crônica de antidepressivos (citalopram e imipramina) durante ou após o período de estresse mostrou-se eficaz para reduzir o consumo excessivo de água (STREKALOVA et al., 2006).

É importante ressaltar que o estresse crônico pode ocasionar disfunções no sistema renina-angiotensina-aldosterona (PHILLIPS, 1987), e diversos estudos mostram que o peptídeo angiotensina II atua em centros hipotalâmicos promovendo aumento da sede (FITZSIMONS, 1998; SKØTT, 2003).

O labirinto em cruz elevado (LCE) e a tarefa de campo aberto (CA) têm sido amplamente utilizados para avaliar o neurocomportamento de animais sobre a influência de agentes ansiogênicos e ansiolíticos (MASSOD et al., 2003). No campo aberto, percebeu-se que os animais do grupo Ec apresentaram atividade locomotora reduzida em relação aos animais do grupo Ct, resultados compatíveis com estudos anteriores (KATZ; ROTH; CARROL, 1981; D'AQUILA, 2000; RYGULA et al., 2005). A redução na atividade locomotora representa a perda de interesse a situações novas, caracterizando um déficit de motivação (RYGULA et al., 2005)

Todos os tratamentos foram eficazes para reverter os efeitos negativos do estresse na atividade locomotora. Pesquisadores demonstraram que o tratamento com L-arginina aumenta a atividade locomotora dos animais no CA, enquanto que o L-NAME diminuiu (JACHIMOWICZ; HOLY; WISNIEWSKI, 1998). Segundo estes pesquisadores, a via L-arginina-NO pode estimular a liberação de glutamato, acetilcolina e dopamina em diferentes regiões do sistema nervoso central. O decréscimo na atividade locomotora induzida por L-NAME pode estar associada a uma redução na liberação de dopamina no estriado. Yamada et al. (1995) mostraram que inibidores da atividade das NOS alteram significativamente a liberação deste neurotransmissor na referida região cerebral.

A L-arginina também reverte o prejuízo locomotor no CA induzido pelo estresse, um efeito bloqueado/agravado por L-NAME, o que evidencia o envolvimento da via L-arginina-NO nestas alterações (MASSOD et al., 2003).

Estudos mostram que a administração de creatina também é eficaz para melhorar a atividade locomotora dos animais no CA. A injeção intracerebral do ácido metilmalônico provoca disfunções no metabolismo energético, caracterizado pela redução dos níveis de fosfocreatina cerebral (ROYES et al., 2003) e inibição das enzimas creatina quinase mitocondriais (SCHUCK et al., 2004). Estas alterações bioquímicas estão associadas ao prejuízo locomotor no CA e podem ser prevenidas pela administração de creatina (VASQUES et al., 2006).

Os resultados mostraram que os animais do grupo Ec apresentaram comportamentos ansiosos no LCE, evidenciados pela aversão pelos braços abertos

do equipamento. A exploração dos braços abertos é inversamente relacionada à ansiedade, e quanto maior a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos, menor a ansiedade do animal (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000).

A coadministração de L-arginina e creatina reverteu potencialmente os efeitos ansiolíticos provocados pelo estresse. Estudos envolvendo a administração concomitante destas substâncias em situações ansiogênicas são raros ou inexistentes. Contudo, investigações anteriores mostraram o envolvimento tanto do sistema Cr/PCr/CK quanto da via L-arginina-NO nas alterações bioquímicas e comportamentais vinculadas à ansiedade. Conforme informações anteriores deste artigo, é provável que a coadministração de L-arginina e creatina promoveu o aumento da biodisponibilidade tanto de creatina quanto de NO.

Recentemente pesquisadores mostraram que alterações nos níveis de creatina no córtex pré-frontal dorsolateral indica prejuízos bioenergéticos, os quais estão correlacionados com a severidade dos sintomas de ansiedade social em adultos (YUE et al., 2012). Observou-se também que a ansiedade em ratos submetidos ao estresse crônico é acompanhada de prejuízos na atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATPases e das enzimas superóxido dismutases na amígdala (CREMA et al., 2010).

Em humanos, estudos mostram benefícios terapêuticos da suplementação com creatina em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático, porém em outros transtornos de ansiedade, os resultados ainda são inconclusivos (ALLEN, 2012).

Em ratos, a suplementação com creatina mostrou-se capaz de reverter os prejuízos causados pelo ácido isovalérico na atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATPases na membrana de neurônios do córtex cerebral (RIBEIRO et al., 2007; 2009). Mais recentemente, pesquisadores mostraram que a administração de creatina no hipocampo de ratos aumenta a atividade das enzimas Na^+ , K^+ - ATPases, e estes efeitos envolvem a neuromodulação de receptores glutamatérgicos NMDA e ativação de calcineurinas (RAMBO et al., 2012).

O estresse agudo por imobilização provoca comportamentos ansiosos no LCE, níveis reduzidos de NO_x (nitrito e nitrato) no cérebro e aumento da corticosterona plasmática. Estas alterações são revertidas pela administração prévia de L-arginina e agravadas pela administração de L-NAME (MASSOD et al., 2003, 2004; GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006; GULATI; CHAKRABORTI; RAY, 2009;

ANAND; KAVITA; RAY, 2012). Por outro lado, ratos induzidos ao estresse crônico por imobilização não demonstram comportamentos ansiosos no LCE, apresentam níveis baixos de corticosterona e uma reversão quase total dos níveis de NOx cerebral em comparação aos animais submetidos ao estresse agudo. Isto evidencia uma adaptação ou tolerância ao estresse, que pode ser significativamente melhorada pela administração prévia de L-arginina (GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006; ANAND; KAVITA; RAY, 2012). O pré-tratamento com L-NAME prejudica a adaptação ao estresse crônico por imobilização (ANAND; KAVITA; RAY, 2012).

Contrariamente, pesquisas mostram que o excesso de NO pode ativar mecanismos intracelulares e gerar radicais livres que prejudicam a atividade das enzimas Na⁺, K⁺, ATPases (LIANG; KNOX, 1999; WYSE et al., 2001). Existem fortes evidências mostrando as relações entre o estresse oxidativo e altos níveis de ansiedade (BOUAYED; RAMMAL; SOULIMANI, 2009).

Os animais do grupo Ct apresentaram pouca preferência pelos alimentos palatáveis (Froot Loops[®]). Isto pode estar vinculado à hipótese de que estes animais também estavam estressados durante a realização do teste, o qual foi realizado concomitantemente com outras tarefas aversivas que provocam estresse nos animais, ou seja, o teste do nado forçado e labirinto aquático de Morris (dados não apresentados neste artigo).

Quando a fase de teste da tarefa de comportamento alimentar foi realizada, os animais controle tinham sido expostos a cinco dias de nado forçado. A literatura aponta que mesmo o estresse agudo pode alterar a ingestão alimentar em roedores. O estresse agudo por imobilização e nado forçado diminuem a ingestão alimentar em ratos, ocasionando um estado de saciedade em função da estimulação de neurônios hipotalâmicos que sintetizam o neuropeptídeo anorexígeno pró-ópio-melanocortina (POMC) (CALVEZ et al., 2011). Não menos importante, o estresse agudo (15 minutos de nado forçado por três dias consecutivos), além de elevar os níveis de corticosterona, pode alterar a quantidade e a qualidade de alimentos consumidos por ratos machos e fêmeas (DIANE et al., 2008).

Um estudo recente mostrou que o aumento dos níveis plasmáticos de leptina durante o estresse agudo pode ser um dos fatores que modulam a baixa ingestão de *comfort food* (alimentos com alto teor de açúcar e gordura) (TOMIYAMA et al., 2012).

O estresse crônico variado também diminui significativamente a preferência dos animais por alimentos doces (GAMARO et al., 2003a, 2003b; RYGULA et al., 2005; BANERJEE et al., 2012). Esta condição é acompanhada do decréscimo da atividade dopaminérgica hipotalâmica, cortical e hipocampal (GAMARO et al., 2003a), redução na atividade das enzimas Na^+ , K^+ -ATPases hipocampais (GAMARO et al., 2003b) e reflete um estado de anedonia, um dos sintomas-chave para o diagnóstico de depressão maior em humanos (RYGULA et al., 2005; BANERJEE et al., 2012).

Os resultados mostraram que os animais que receberam L-arginina e creatina isoladamente ou em conjunto, aumentaram significativamente o consumo de alimentos palatáveis (Froot Loops[®]) em relação aos animais dos grupos Ct e Ec. Estudos mostram que o NO está intimamente relacionado com o aumento da ingestão de alimentos e água (MORLEY, et al., 1991; CALAPAI et al., 1992). Inibidores da atividade das enzimas NOS produzem efeitos anoréticos e reduzem o ganho de peso corporal de ratos magros e obesos (SQUADRITO et al., 1993).

A leptina inibe a atividade da NOS diencefálica e aumenta o metabolismo da serotonina em ratos, sugerindo que os efeitos anoréticos da leptina também estão vinculados às alterações no metabolismo da serotonina. O efeito anorético da leptina pode ser revertido pela coadministração de L-arginina, um indicativo de que a via L-arginina-NO está envolvida na mediação dos efeitos da leptina no comportamento alimentar (CALAPAI et al., 1999).

Estudos recentes mostram que o NO também parece ser o mensageiro final da ação de alguns neuropeptídeos orexígenos. A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de grelina e/ou orexina A aumenta significativamente o consumo de alimento por camundongos em estado de saciedade, um efeito bloqueado pela administração concomitante de L-NAME. Estes resultados sustentam a evidência de que os efeitos orexígenos da grelina e orexina A estão relacionados com a produção de NO na região hipotalâmica (GASKIN et al., 2003; FARR et al., 2005).

Embora menos evidente na literatura, a creatina também desempenha um papel importante na ingestão de alimentos, porém os possíveis mecanismos bioquímicos subjacentes estão longe de serem suficientemente esclarecidos. Pesquisadores perceberam que a infusão i.c.v. de cobalto protoporfirina IX (CoPP) (substância anorexígena) promove um decréscimo significativo nas concentrações

de fosfocreatina e creatina no hipotálamo de ratos, em torno de 20 e 40%, respectivamente. Os pesquisadores notaram também que a infusão i.c.v. do ácido β -guanidinopropiônico (β -GPA) (substância que diminuiu as concentrações intracelulares de creatina) promove um decréscimo na ingestão alimentar e peso corporal dos animais, fatores acompanhados pelo aumento da expressão da proteína Fos hipotalâmica. O aumento da expressão da proteína Fos pode ser um indicativo da ativação celular em resposta a depleção de creatina, e sua localização dentro do hipotálamo, talvez seja uma evidência do seu envolvimento na mediação dos efeitos hipofágicos do β -GPA (GALBRAITH; FURUKAWA; LI, 2006).

Como mencionado anteriormente, o estresse crônico variado promove a diminuição da ingestão de alimentos doces e prejuízo da atividade das enzimas Na^+ , K^+ , - ATPases hipocâmpais (Gamero et al., 2003b). Desta forma, acredita-se que a creatina também contribuiu para a maior ingestão de alimentos palatáveis em função do seu reconhecido papel protetor e neuromodulador da atividade desta enzima (RIBEIRO et al., 2009; RAMBO et al., 2012).

Em resumo, os resultados deste estudo mostraram que o modelo de estresse crônico empregado provoca comportamentos ansiosos e prejudica a atividade locomotora dos animais. Todos os tratamentos foram capazes de melhorar a atividade locomotora e aumentaram a ingestão de alimentos palatáveis (Froot Loops[®]). Efeitos ansiolíticos foram observados apenas nos animais tratados concomitantemente com L-arginina e creatina. Concluindo, este estudo mostrou que a coadministração de L-arginina e creatina proporciona melhora em todos os parâmetros comportamentais avaliados, por isso demonstra superioridade em relação à administração isolada destas substâncias. Levando em consideração os aspectos bioquímicos, é provável que a coadministração de L-arginina e creatina aumentou tanto os níveis de creatina quanto de NO, os quais mostram íntima relação com todos os parâmetros comportamentais avaliados.

REFERÊNCIAS

As referências citadas neste capítulo encontram-se ao final da dissertação na sessão de Referências Bibliográficas.

4.2 Capítulo II: Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado. Foram utilizados 34 ratos *Wistar* com aproximadamente 120 dias no início dos experimentos. Os animais foram aleatoriamente e igualmente divididos em cinco grupos experimentais: controle (Ct), estresse crônico (Ec), estresse crônico + L-arginina (Ec/La), estresse crônico + creatina (Ec/Cr) e estresse crônico + L-arginina + creatina (Ec/La+Cr). Os animais foram expostos ao estresse por um período de 40 dias, e diariamente e aleatoriamente escolheu-se um dos seguintes estressores: ambiente congestionado, exposição ao frio, imobilização, inclinação da caixa-moradia, luz intermitente, privação de alimento e ruído. Em torno de quatro dias após a última sessão de estresse, os animais foram submetidos à avaliação da memória espacial (referência e trabalho) no labirinto aquático de Morris. No dia posterior à última sessão de teste, os animais foram sacrificados mediante decapitação, o sangue troncular foi coletado para análise dos níveis de corticosterona e o coração e glândula adrenal esquerda foram pesados. Os resultados mostraram que a administração isolada de L-arginina provocou hipertrofia cardíaca. A administração isolada de creatina melhorou significativamente a memória espacial de trabalho e reduziu o peso relativo da glândula adrenal esquerda. A coadministração de L-arginina e creatina proporcionou uma redução significativa no peso relativo da glândula adrenal esquerda, bloqueou os efeitos hipertróficos cardíacos da L-arginina e habilitou a ocorrência do aprendizado espacial. Concluindo, este estudo mostrou que a administração isolada de creatina melhora significativamente a memória espacial de trabalho, e quando administrada em conjunto com a L-arginina, habilita a ocorrência do aprendizado espacial em um protocolo de treinamento que não promove aprendizagem nos animais do grupo Ct.

Palavras-chave: estresse crônico; L-arginina; creatina; memória espacial

Chapter II: Effects of administration of L-arginine and creatine on spatial memory in rats submitted to a model of chronic variable stress.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of administration of L-arginine and creatine on spatial memory in rats submitted to a model of chronic variable stress. The study included 34 male *Wistar* rats, approximately 120 days at the beginning of the experiments. The animals were divided equally and randomly into five groups: control (Ct), chronic stress (Ec); chronic stress + L-arginine (Ec/La); chronic stress + creatine (Ec/Cr) and chronic stress + L-arginine + creatine (Ec/La + Cr). The animals were exposed to stress for a period of 40 days and daily and randomly one of the following stressors were applied: crowded environment, exposure to cold, restraint, inclination of home cage, flashing light, food deprivation and noise. Approximately four days after the last session of stress, the animals were subjected to evaluation of spatial memory (working and reference) in the Morris water maze. The day after the last test session, the animals were sacrificed by decapitation, trunk blood was collected for analysis of corticosterone levels and heart and left adrenal gland were weighed. The results showed that the administration of L-arginine alone provoked cardiac hypertrophy. A single administration of creatine significantly improved spatial working memory and reduced the relative weight of the left adrenal gland. The coadministration of L-arginine and creatine provided a significant reduction in the relative weight of the left adrenal gland, blocked the hypertrophic cardiac effects of L-arginine and enabled the occurrence of spatial learning. In conclusion, this study showed that administration of creatine alone provided significant improvement in spatial working memory, and when administered in combination with L-arginine, has enable the occurrence of spatial learning in a training protocol that did not promote learning in group Ct.

Keywords: chronic stress; L-arginine; creatine; spatial memory

INTRODUÇÃO

A resposta de estresse, nos mamíferos, integra componentes fisiológicos e psicológicos frente a adversidades reais ou percebidas como tais (HERMAN et al., 2012). É uma resposta relativamente estereotipada e inata, que evoluiu para coordenar a homeostase e proteger os organismos durante estressores agudos (CHROUSOS, 2009).

Há duas principais classes de hormônios do estresse: os glicocorticóides (corticoesterona em animais e cortisol em humanos) e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Os glicocorticóides (GCs), quando secretados transitoriamente, contribuem para a sobrevivência, porém em quantidades excessivas são altamente nocivos para diversos órgãos e sistemas, aumentando os riscos de hipertensão, diabetes mellitus insulino-dependente, amenorreia, impotência, úlceras e supressão imunológica (SAPOLSKY, 2000).

O SNC é um dos principais alvos do excesso de GCs. Estudos mostram que concentrações elevadas destes hormônios podem prejudicar estruturas cerebrais como amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo (SWAAB; BAO; LUCASSEN, 2005), sendo esta última provavelmente a mais vulnerável aos efeitos dos GCs em função da quantidade elevada de receptores para esse hormônio (SAPOLSKY, 2003). O excesso de GCs pode causar atrofia de neurônios hipocampais (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; SOUZA et al., 2000), inibir a neurogênese e provocar morte de neurônios hipocampais (McEWEN, 1999, SAPOLSKY, 2000), influenciando também a estrutura e funcionamento dos neurônios pré-frontais (YUEN et al., 2009). Estas alterações estão vinculadas a prejuízos de memória espacial no labirinto aquático de Morris (VASCONCELLOS et al., 2003; MIKA et al., 2012), labirinto em Y (KLEEN et al., 2006) labirinto radial de 8 braços (LUINE; VILLEGAS; McEWEN, 1994) e labirinto de Barnes (McLAY; FREEMAN; ZADINA, 1998).

A L-arginina é um aminoácido que participa da síntese de proteínas e está envolvido em diversas vias metabólicas que produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos (agmatina, glutamato, poliaminas, ornitina, citrulina) (CAMPBELL; BOUNTY; ROBERTS, 2004) e com a secreção de hormônios (somatotrofina, prolactina, insulina, glucagon, somatostatina e catecolaminas) (SUCHNER; HEYLAND; PETER, 2002). Contudo, parece provável que o destino metabólico mais estudado da L-arginina seja a produção do gás óxido nítrico (NO)

(BÖGER et al., 2007), que apresenta diversas funções ao nível do SNC, como percepção da dor, controle do sono, termorregulação, apetite, liberação de neurotransmissores, desenvolvimento e sobrevivência neural (GUIX et al., 2005), com participação importante no processo de aprendizagem e memória em função de sua capacidade de fortalecer mecanismos intracelulares envolvidos em formas de plasticidade sináptica no hipocampo (ESPLUGUES, 2002).

A L-arginina também participa da síntese de creatina, um composto guanidínico particularmente envolvido no metabolismo energético e que também possui propriedades antioxidantes (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006; YOUNG et al., 2010). A creatina pode funcionar como neuroprotetora em diversos modelos de distúrbios neurológicos, especialmente aqueles que envolvem prejuízos no metabolismo energético e estresse oxidativo, como as doenças neurodegenerativas (MATTHEWS et al., 1999; FERRANTE et al., 2000; BÜRKLEN et al., 2006), doenças neurológicas agudas (SULLIVAN et al., 2000; PRASS et al., 2007), doenças neuromusculares e neurometabólicas (TARNOPOLSKY, 2007), doenças vinculadas a erros inatos do metabolismo (ANDRES et al., 2008), distúrbios psiquiátricos (CUNHA et al., 2012) e alterações cognitivo-comportamentais vinculadas ao estresse psicológico (KOGA et al. 2005, McMORRIS et al., 2006, 2007a). A literatura aponta fortes evidências de que a suplementação com creatina pode desempenhar um papel crítico em uma gama de funções cognitivas, incluindo memória, atenção, linguagem, emoções (ALLEN, 2012).

Considerando o envolvimento das substâncias apresentadas com o SNC e cognição, este artigo teve por objetivo verificar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre a memória espacial de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS EXPERIMENTAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 34 ratos *Wistar* adultos (~120 dias no início dos experimentos) com peso médio de aproximadamente 374 gramas. Com exceção as atividades de estresse e tarefas comportamentais, os animais permaneceram em suas caixas-moradias em um ambiente com condições controladas de temperatura

($26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com acesso à água e ração da marca PURINA[®] *ad libitum* (exceto os animais sob estresse no período em que o estressor aplicado foi privação de alimento). Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais constituídos de 7 animais cada um: (Ct) controle, (Ec) estresse crônico, (Ec/La) estresse crônico + L-arginina, (Ec/Cr) estresse crônico + creatina e (Ec/La+Cr) estresse crônico + L-arginina + creatina.

O tratamento ocorreu por meio da técnica de gavagem, durante todo o experimento (estresse + tarefas comportamentais). Buscou-se evitar qualquer forma de estresse nos animais do grupo Ct, por isso optou-se por não utilizar o procedimento de gavagem nestes animais. Os reagentes foram administrados nas seguintes dosagens:

- Grupo Ec: solução de 1ml contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/La: solução de 1ml composta por 500mg/Kg de L-arginina + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/Cr: solução de 1ml contendo 300mg/Kg de creatina monohidratada + 0,5% de CMC e água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/La+Cr: solução de 1,5ml contendo 500mg/Kg de L-arginina + 300mg/Kg de creatina monohidratada + 0,5% de CMC e água purificada q.s.p.

MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

Utilizou-se um modelo de estresse crônico variado adaptado de Gamaro et al. (2003a, 2003b) e Vasconcellos et al. (2003, 2005). A exposição ao estresse aconteceu durante 40 dias, período necessário para que os níveis de corticosterona se elevem em aproximadamente 90% (VASCONCELLOS et al., 2005). Os animais do grupo Ct permaneceram em suas caixas-moradias durante todo o período de estresse, recebendo somente cuidados diários comuns, como troca de maravalha, água e ração.

Os estressores utilizados foram: ambiente congestionado (7 animais por caixa-moradia durante 24h), exposição ao frio (1h), imobilização (1-2h), inclinação da caixa-moradia em um ângulo aproximado de 45° (2-4h), luz intermitente (1-2h), privação de alimento (24h) e ruído (15-40min). Aplicou-se diariamente e de forma aleatória, 1 entre os 7 estressores, em períodos e horários diferentes na tentativa de

minimizar a previsibilidade do animal em relação ao estressor (VASCONCELLOS et al., 2005).

O estresse por inclinação da caixa-moradia ocorreu mediante a inserção de um tijolo abaixo da mesma. Para a realização da exposição ao frio, utilizou-se uma caixa de isopor de 80 litros ventilada com a temperatura aproximada de 5 a 7°C controlada por dois termômetros da marca INCOTERM®. Na atividade de imobilização, os animais foram inseridos no interior de garrafas *Pet de Coca Cola*® de 600 ml, ficando impossibilitados de se locomover, porém livres para a realização dos movimentos respiratórios necessários. O ruído foi realizado por meio de 3 alarmes magnéticos de 90db cada, fixados nas paredes do ambiente em que os animais eram mantidos. Para a exposição ao estressor “luz intermitente” as caixas-moradias foram agrupadas em um ambiente ausente de iluminação contendo 4 lâmpadas “pisca-pisca” de 15 watts cada.

AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

A avaliação da memória espacial iniciou-se no 45º dia de experimento. Para este estudo foi utilizado uma versão adaptada do labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984), um tanque circular preto medindo 135 cm de diâmetro preenchido com água em uma temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, contendo em seu interior uma plataforma de escape confeccionada em acrílico nas dimensões de 10x10 cm, localizada 1,5 cm abaixo da superfície da água.

O equipamento ficou localizado em uma sala com aproximadamente 7,5m² cujas paredes eram ricas em pistas visuais, por exemplo, objetos coloridos confeccionados com etileno acetato de vinila EVA, bem como o experimentador localizado sempre na mesma posição (aproximadamente 1,5m do tanque) para facilitar a orientação do animal. Foi adicionado 300g de amido de milho para tornar a água turva e dificultar a visualização da plataforma pelo animal. Na superfície da circunferência do tanque, também foram inseridos objetos confeccionados com EVA indicando quatro pontos cardeais (norte, sul, leste, oeste), que delimitavam o tanque em quatro quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (1º quadrante, 2º quadrante, 3º quadrante e 4º quadrante). Os pontos cardeais também denotam as posições de largada dos animais.

Em cada sessão de nado, os animais foram inseridos pelo experimentador no tanque com o focinho voltado para um dos pontos cardeais e nadavam livremente até encontrar a plataforma, e uma vez nesta, permaneciam por 10 segundos. Caso atingissem o tempo máximo de 60 segundos sem encontrar a plataforma, os animais eram gentilmente conduzidos pelo experimentador até a mesma. Depois de cada sessão de nado, os animais eram secados com auxílio de uma toalha e aquecedor e posteriormente retornavam às suas caixas-moradias.

Para avaliar a memória espacial de referência foram 5 dias consecutivos de treinamento ou aquisição da memória (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005; ROSSATO et al., 2006, 2007). O objetivo principal desta atividade foi encontrar a plataforma fixada sempre no mesmo local (centro do 2º quadrante). Cada animal foi submetido a 4 sessões de nado diárias por um período máximo de 60 segundos (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005), partindo de posições diferentes, conforme apresentado no Quadro 1. Estabeleceu-se um intervalo de 10 minutos entre cada tentativa.

Quadro 1 – Posições de largada dos animais nos dias de aquisição da memória de referência.

Dia	Posições de largada
1	N – S – L – O
2	O – L – S – N
3	S – O – N – L
4	L – N – O – S
5	N – L – S – O

Fonte: o autor

Em torno de vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento, realizou-se a fase de *retenção* ou teste (50º dia de experimento). Esta fase foi realizada mediante uma única sessão de nado para cada animal, com duração de 60s na ausência da plataforma de escape. Foram avaliados os seguintes parâmetros vinculados à memória espacial de referência: (a) latência para encontrar o local onde estava a plataforma nas sessões de treinamento (b) % tempo de permanência no quadrante alvo (MELLO et al., 2008).

A avaliação da memória espacial de trabalho iniciou-se no 52º de experimento, em torno de quarenta e oito horas após a sessão de retenção da memória espacial de referência. Esta tarefa utilizou o mesmo equipamento e princípios da tarefa anterior, porém foram quatro dias consecutivos de teste (52º, 53º, 54º e 55º dias de experimento), com a plataforma localizada em posições

diferentes a cada dia, conforme apresentado no Quadro 2. Desta forma, nas primeiras tentativas de cada dia (fase de aquisição) os animais tiveram que encontrar a plataforma em uma posição diferente, porém nas três tentativas subsequentes (fase de retenção), a plataforma permaneceu na mesma posição, contudo os animais iniciavam a sessão a partir de pontos cardeais diferentes (VASCONCELLOS et al., 2003).

Quadro 2 – Localização da plataforma e posições de largada dos animais nos dias de teste da memória de trabalho

Dia	Localização da plataforma	Posições de largada
1	1º Quadrante	N – S – L – O
2	2º Quadrante	O – L – S – N
3	3º Quadrante	S – O – N – L
4	4º Quadrante	L – N – O – S

Fonte: o autor

O desempenho em memória espacial de trabalho foi avaliado mediante o cálculo da latência para encontrar a plataforma nas sessões 1, 2, 3 e 4 durante os 4 dias de teste (NETTO et al., 1993).

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA

Em torno de vinte e quatro horas após a última sessão de teste comportamental, os animais foram sacrificados mediante decapitação e o sangue troncular foi coletado para análise bioquímica dos níveis plasmáticos de corticosterona, determinados pelo método de quimioluminescência. Os resultados foram expressos em µg/ml.

PESO RELATIVO DA ADRENAL ESQUERDA, CORAÇÃO E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

O coração e a glândula adrenal esquerda foram pesados em balança eletrônica. Os dados foram expressos em g de tecido por 100 g de peso corporal (g/100g).

O peso do coração também foi utilizado para o cálculo do índice de hipertrofia cardíaca (IHC), expresso pela seguinte relação: peso do coração (mg) / peso do animal (g). (WALLEN et al., 2000).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

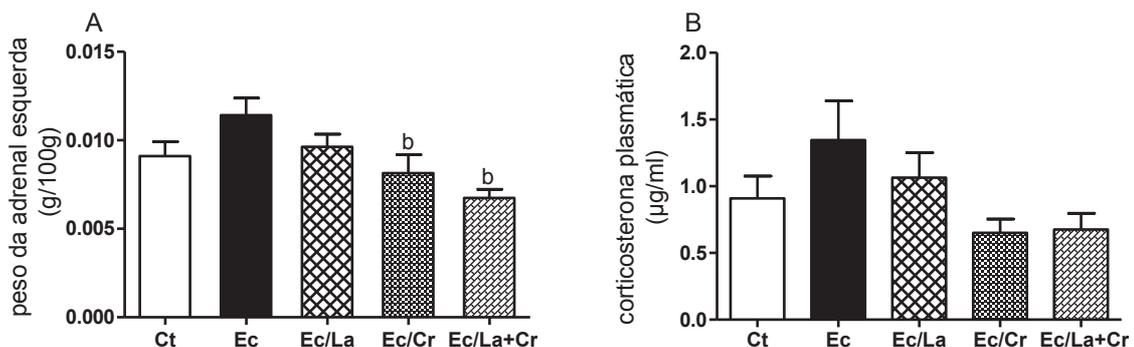
Os resultados foram expressos em média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Utilizou-se ANOVA de uma via para todos os parâmetros, seguido do *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

PESO RELATIVO DA GLÂNDULA ADRENAL ESQUERDA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA

Os resultados mostraram que os animais dos grupos Ec/Cr e Ec/La+Cr apresentaram o peso relativo da glândula adrenal esquerda em torno de 29 e 41% maior que os animais do grupo Ec ($F(4,29) = 4,14$, $P < 0,05$) (Gráfico 1A). Observou-se também uma forte tendência de diferença entre os grupos quanto aos níveis plasmáticos de corticosterona ($F(4,28) = 2,33$, $P = 0,08$) (Gráfico 1B).

Gráfico 1 – (A) Peso relativo da glândula adrenal esquerda e (B) níveis plasmáticos de corticosterona.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. O peso da glândula adrenal esquerda está representado em g de tecido corporal por 100g de peso corporal (g/100g). O símbolo acima da barra indica as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

PESO RELATIVO DO CORAÇÃO E ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

Em relação ao peso relativo do coração e índice de hipertrofia cardíaca (IHC), os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos. Os animais do grupo Ec/La apresentaram peso relativo do coração ($F(4,29) = 3,99$, $P < 0,05$) e IHC

($F(4,29) = 0,35$, $P < 0,05$) aproximadamente 28% maior que os animais do grupo Ct (Tabela 1).

Tabela 1 – Peso relativo do coração (g/100g) e índice de hipertrofia cardíaca (IHC)

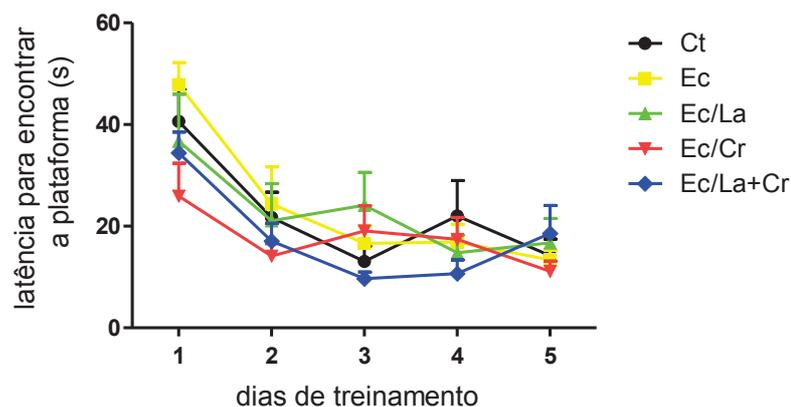
Parâmetro	Ct	Ec	Ec/La	Ec/Cr	Ec/La+Cr
Peso g/100g	0,35±0,02	0,34±0,01	0,45±0,03 ^{a,b}	0,38±0,01	0,39±0,03
IHC mg/g	3,52±0,23	3,40±0,12	4,53±0,30 ^{a,b}	3,82±0,16	3,94±0,27

Os dados estão expressos em média ± E.P.M. O peso do coração está representado em g de tecido por 100g de peso corporal (g/100g). O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado mediante a fórmula indicada na sessão de materiais e métodos. Os símbolos acima dos números indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$ usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. a=Ct; b=Ec; c=Ec/La; d=Ec/Cr; e=Ec/La+Cr.

AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

Os resultados mostraram que os animais de todos os grupos diminuíram a latência para encontrar a plataforma no decorrer dos cinco dias de treinamento (ANOVA de uma via/SNK, $P < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos durante os cinco dias de treinamento (ANOVA de uma via/SNK, $P > 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Desempenho dos grupos na fase de aquisição da memória

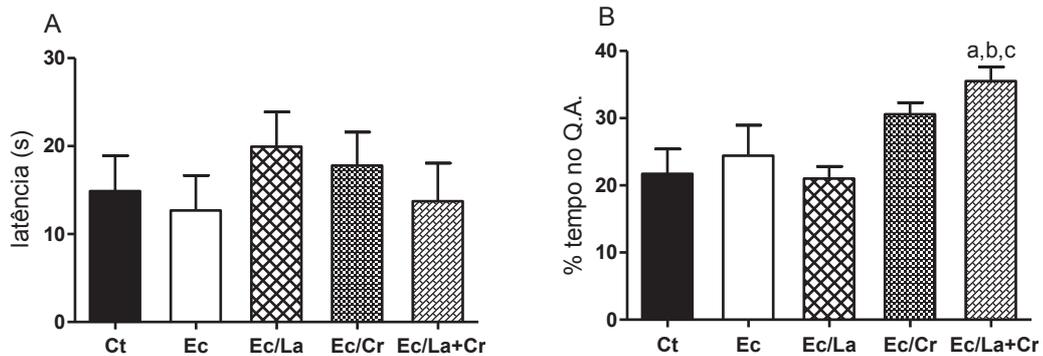


Os dados estão expressos como média ± E.P.M. Estes valores representam a mediana da latência para encontrar a plataforma durante os cinco dias de treinamento (fase de aquisição da memória). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos (ANOVA de uma via/SNK, $p > 0,05$, $n=7-6$ animais/grupo).

No dia de teste de retenção da memória de referência, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos quanto à latência para encontrar o local onde estava a plataforma nos dias de treinamento ($F(4,29) = 0,56$, $P = 0,69$) (Gráfico 3A).

Contudo, verificou-se que os animais do grupo Ec/La+Cr permaneceram mais tempo no quadrante-alvo em comparação aos animais Ct, Ec e Ec/La, nas proporções de 38, 31 e 41%, respectivamente ($F(4,29) = 3,96, P < 0,05$) (Gráfico 3B).

Gráfico 3 – Fase de retenção da memória: (A) Latência para encontrar a plataforma e (B) % de tempo no quadrante alvo (Q.A.)

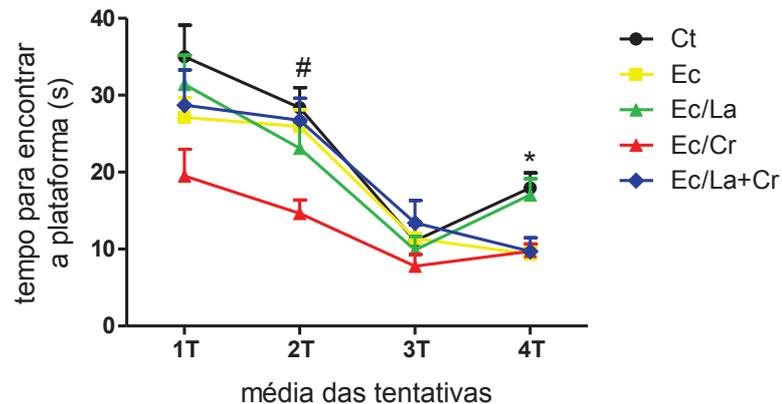


Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam a (A) latência para encontrar a plataforma e (B) % de tempo transcorrido no quadrante onde se localizava a plataforma nas sessões de treinamento. Os símbolos acima da barra indica as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7$ -animais/grupo. a: Ct; b: Ec; c: Ec/La; d: Ec/Cr; e: Ec/La+Cr.

Na memória espacial de trabalho, percebeu-se que os animais de todos os grupos diminuíram o tempo para encontrar a plataforma ao longo das tentativas (ANOVA de uma via/SNK, $P < 0,05$). Todos os grupos reduziram o tempo para encontrar a plataforma da 1ª para 3ª e da 1ª para 4ª tentativa (ANOVA de uma via/SNK, $P < 0,05$). Os animais do grupo Ct, Ec e Ec/La+Cr reduziram também o tempo para encontrar a plataforma da 2ª para 3ª e da 2ª para 4ª tentativa (ANOVA de uma via/SNK, $P < 0,05$).

Comparando o desempenho dos grupos entre si, observou-se que nas segundas tentativas, os animais do grupo Ec/Cr tiveram desempenho superior a todos os grupos ($F(4,29) = 4,50, P < 0,05$). Nas quartas tentativas, verificou-se que os animais do grupo Ct, Ec/Cr e Ec/La+Cr tiveram melhor desempenho que os animais dos grupos Ct e Ec/La ($F(4,29) = 7,19, P < 0,05$). Observou-se uma forte tendência de diferença entre os grupos nas primeiras tentativas ($F(4,29) = 2,47, P = 0,06$). O gráfico 4 mostra com detalhes estas questões.

Gráfico 4 – Latência para encontrar a plataforma no teste de memória espacial de trabalho.



Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Estes valores representam a média de cada uma das quatro tentativas durante os quatro dias de teste de memória espacial de trabalho. Os símbolos (# e *) acima das barras indicam as diferenças estatísticas de $p < 0,05$, usando ANOVA de uma via/SNK, $n=7-6$ animais/grupo. #Diferença estatística entre o grupo Ec/Cr em relação aos demais grupos na 2ª tentativa. *Diferença estatística entre os grupos Ct e Ec/La em comparação aos grupos Ec, Ec/Cr e Ec/La+Cr na 4ª tentativa.

DISCUSSÃO

Os animais do grupo Ec apresentaram o peso relativo da glândula adrenal esquerda significativamente maior que os animais dos grupos Ec/Cr e Ec/La+Cr. Estudos mostram que o aumento da liberação de corticosterona está associado com o crescimento das glândulas adrenais e envolve processos de hiperplasia e hipertrofia celular em sub-regiões adrenais específicas (ULRICH-LAI et al., 2006).

Neste estudo, os níveis plasmáticos de corticosterona não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos e os níveis de ACTH não foram avaliados. Estudos anteriores usando diferentes modelos de estresse mostraram que durante o estresse agudo os níveis plasmáticos de corticosterona aumentam significativamente nos animais estressados enquanto que no estresse crônico os animais estressados apresentam os níveis deste hormônio similares aos animais controle, evidenciando uma possível adaptação do eixo HPA ao estresse (AZPIROZ et al., 1999; GULATI; MASSOD; VIJAYAN, 2006; SASSE et al., 2008).

A suplementação com creatina diminuiu os níveis de corticosterona e outras respostas do estresse em pintos submetidos ao estresse por separação social (KOGA et al., 2005). Pesquisadores verificaram também que a administração de L-arginina pode decrescer significativamente a produção de corticosterona basal ou induzida pelo ACTH em células da zona fasciculada do córtex adrenal, efeitos

vinculados à síntese de NO, os quais são anulados pela administração de L-NAME (GIORDDANO et al, 1996; CYMERYNG; DADA; PODESTÁ, 1998, CYMERYNG et al., 1999).

Smriga et al. (2007) observaram que a administração concomitante de L-arginina e L-lisina reduz a ansiedade, os níveis de cortisol e cromogranina A em humanos em estado de estresse. É importante ressaltar que a L-arginina também diminui a secreção de adrenalina pela medula adrenal, diminui a atividade simpática e aumenta a parassimpática (LECHIN et al., 2006).

Notou-se também que os animais do grupo Ec/La+Cr mostraram comportamentos ansiolíticos em todos os parâmetros do labirinto em cruz elevado (dados apresentados no artigo anterior). Estudos apontam que altos níveis de ansiedade e depressão estão relacionados com a hipertrofia adrenal, pois estas são condições associadas à hiperativação do eixo HPA (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

O estresse crônico pode gerar hipertrofia cardíaca em camundongos e ratos (COSTOLI et al., 2004; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2012), porém os mecanismos fisiológicos responsáveis pela remodelação cardíaca ainda são pouco conhecidos (BRUDER-NASCIMENTO, et al., 2012).

A hiperatividade simpática e a consequente liberação de catecolaminas são apontadas como um dos principais fatores responsáveis pelo remodelamento cardíaco. Existem fortes evidências experimentais e clínicas que sustentam um paralelismo entre a hiperativação do SNA simpático e hipertrofia do miocárdio, porém a exata contribuição deste sistema ainda parece indeterminada e outras causas hemodinâmicas além da elevação da pressão arterial não foram totalmente excluídas como determinantes do crescimento hipertrófico (FRANCHINI, 2001).

Neste estudo, observou-se que os animais do grupo Ec/La apresentaram o peso do coração e índice de hipertrofia cardíaca significativamente aumentados em comparação aos animais dos grupos Ct e Ec. A maioria dos estudos mostra que a L-arginina atenua a hipertrofia cardíaca em roedores hipertensos (MATSUOKA et al., 1996; FENNING et al., 2005). Contrariando estes resultados e colaborando com os dados obtidos no presente estudo, Rose'Meyer et al. (2008) observaram que a administração crônica de L-arginina pode aumentar o peso do coração de ratos em aproximadamente 17,6%, uma condição acompanhada pela redução na expressão

de todos os receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3) e das enzimas iNOS e eNOS cardíacas.

O estresse oxidativo também tem sido apontado como um dos maiores fatores para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Uma das fontes mais conhecidas de radicais livres é o NO cujo aumento da produção reage com peróxidos e formam o ânion peroxinitrito (MAULIK; KUMAR, 2011). A produção exagerada deste radical está associado à fibrose, hipertrofia e dilatação cardíaca (MUNGRUE et al., 2002).

A coadministração de L-arginina e creatina não provocou hipertrofia cardíaca nos animais, indicando assim um possível efeito cardioprotetor da creatina em relação à L-arginina. A disponibilidade reduzida de creatina tem sido associada com quadros de insuficiência cardíaca, prevalência aumentada de arritmias ventriculares, isquemia e instabilidade de membranas das células do miocárdio durante a isquemia (CONWAY; CLARK, 1996; ANDREWS et al., 1998; NAGAI et al., 2004). A suplementação com fosfocreatina mostrou-se eficaz para a manutenção dos níveis de fosfatos de alta energia e integridade estrutural do sarcolema, prevenindo danos peroxidativos e melhorando a microcirculação cardíaca (CLARK, 1998). As alterações hipertróficas cardíacas de equinos treinados em esteira rolante podem ser reduzidas com a suplementação crônica de creatina (PEREIRA, 2006).

Embora os efeitos benéficos da creatina no metabolismo energético sejam os mais pronunciados pela literatura, é importante mencionar sua propriedade antioxidante (LAWLER et al.; 2002), que teoricamente pode estar vinculada com o bloqueio da hipertrofia cardíaca nos animais do grupo Ec/La+Cr mediada pelo excesso de peroxinitrito induzido pelas altas concentrações de NO.

Na fase de teste da memória espacial de referência (fase de retenção da memória), percebeu-se que os animais do grupo Ct permaneceram menos de 25% do tempo no quadrante onde se localizava a plataforma nas sessões de treinamento (fase de aquisição da memória). Este fator é um indicativo de deficiência no processo de aprendizagem espacial. Os animais que aprendem o local da plataforma geralmente permanecem mais de 25% do tempo no quadrante onde esta se localizava nas sessões de treinamento (STEWART; MORRIS, 1993). Neste estudo, é possível que determinadas particularidades do protocolo de treinamento, fatores motivacionais dos animais e as características físicas do equipamento utilizado tenham dificultado a aquisição da memória espacial.

Na fase de treinamento da memória espacial de referência, os animais controle e cronicamente estressados não apresentaram diferenças de desempenho, resultados similares aos obtidos por Vasconcellos et al. (2003). Contudo, a maioria dos estudos mostra que o estresse crônico prejudica a aquisição da memória espacial no labirinto aquático de Morris (LAM), porém algumas questões importantes precisam ser consideradas, por exemplo, os fatores motivacionais (CONRAD, 2010).

Os fatores motivacionais exercem grande influência no processo de aquisição da memória espacial. O grau de severidade de um protocolo de treinamento pode influenciar profundamente a motivação dos animais para aprender a localização da plataforma (CONRAD, 2010). Um estudo mostrou que ratos cronicamente estressados testados no labirinto em Y com água fria (19°C) apresentam dificuldades no processo de aquisição da aprendizagem espacial, diferente daqueles testados em água quente (24°C) que não sofrem nenhum efeito (WRIGHT; CONRAD, 2008). Neste estudo, utilizou-se um equipamento com água a uma temperatura de $21\pm 1^\circ\text{C}$. Estudos anteriores utilizando o mesmo protocolo de aprendizagem e um modelo de estresse crônico bastante similar mostraram que os animais controle são capazes de aprender a localização da plataforma em labirintos preenchidos com água a uma temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$ (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005) e constante de 23°C (TAGLIARI et al., 2011).

O diâmetro reduzido do labirinto aquático também pode ter influenciado o desempenho dos animais nas sessões de treinamento. Neste estudo, utilizou-se um labirinto com diâmetro de 135cm, aproximadamente 32,5% menor que o equipamento utilizado por Tagliari et al. (2011). Estes pesquisadores observaram uma superioridade no desempenho dos animais controle em relação aos cronicamente estressados nos três últimos dias de treinamento. Segundo Conrad (2010), quando o estresse crônico prejudica o desempenho dos animais nas últimas sessões de treinamento, estes déficits também podem aparecer na sessão de teste subsequente.

Neste estudo, permitiu-se que cada animal permanecesse por 10 segundos quando localizava a plataforma durante as sessões de treinamento (VASCONCELLOS et al., 2003, 2005), ao invés de 20 (MIYOSHI et al., 2012) ou 30 segundos (ROSSATO et al., 2006, 2007; SILVA et al., 2008). O tempo reduzido na plataforma de escape pode ter dificultado o estabelecimento da relação entre as

pistas espaciais do ambiente e a posição da plataforma, prejudicando o processo de aprendizagem espacial.

A exposição ao estresse agudo certamente influenciou o desempenho dos animais do grupo Ct durante o processo de aquisição da memória espacial. Estes animais passaram pelo teste de nado forçado⁶ imediatamente antes de iniciar a fase de treinamento no LAM, o que pode ter levado a aprendizagem equivocada da inexistência da plataforma ou qualquer meio de escape do LAM.

O nado forçado é um estressor e pode elevar os níveis de corticosterona mesmo quando usado em protocolos de estresse agudo (DIANE et al., 2008). O estresse agudo pode interferir profundamente nos substratos neurais responsáveis pela formação da memória em humanos (HENCKENS et al., 2009), sendo capaz de interromper a recuperação da memória espacial dependente do hipocampo em roedores por meio da facilitação de processos de depressão de longa duração (LTD) hipocampais, que são necessários e suficientes para a expressão dos efeitos negativos do estresse na memória espacial avaliada no labirinto aquático de Morris (WONG et al., 2007). Contudo, contrariamente, há estudos demonstrando que o estresse agudo pode melhorar a aprendizagem e memória, em que níveis leves e moderados de glicocorticóides podem facilitar os processos de LTP no hipocampo (SAPOLSKY, 2004; JÖELS et al., 2006).

Vale lembrar que outros estudos também relataram efeitos diferenciais nas fases de aquisição e retenção da memória espacial de referência. Estas discrepâncias podem ser correlacionadas às características diferentes destas fases (VASCONCELLOS et al., 2003). Na fase de aquisição da memória são sessões de nado repetitivas cujo objetivo principal é diminuir a latência para encontrar a plataforma, enquanto que na fase de retenção, uma das consequências do aprendizado espacial é permanecer o maior tempo possível no quadrante onde se localizava a plataforma nas sessões de treinamento.

A coadministração de L-arginina e creatina habilitou o aprendizado espacial nos animais. Estudos envolvendo a coadministração de L-arginina e creatina são

⁶O Teste do Nado Forçado (TNF) é um instrumento desenvolvido por Porsolt; Bertin; Jalfre (1977) destinado a avaliar comportamentos depressivos em camundongos e ratos. Os animais que apresentam níveis elevados de imobilidade no TNF são considerados desmotivados ou demonstram “desespero comportamental”, característica importante da depressão em humanos. O protocolo de aplicação do TNF consiste em uma sessão de habituação com a duração de 15 minutos e uma sessão de teste realizada 24 horas depois e com a duração de 5 minutos (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977, PORSOLT et al., 1978).

bastante raros, porém algumas questões importantes precisam ser consideradas em relação à suplementação com estas substâncias. A literatura mostra que a formação de NO reflete apenas a minoria do fluxo da L-arginina (~1%), e a grande proporção deste aminoácido participa da biossíntese de creatina (JAHANDIR et al., 2009).

O primeiro passo da síntese endógena de creatina nos mamíferos consiste na formação de guanidinoacetato (GAA) a partir dos aminoácidos L-arginina e glicina, uma reação catalisada pela enzima arginina: glicina amidinotransferase (AGAT) (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000; DERAIVE et al., 2004). Contudo, a síntese de guanidinoacetato (GAA) é um passo limitante na biossíntese de creatina. Existe um mecanismo de regulação por *feedback* negativo exercido pela própria creatina na AGAT, provavelmente ao nível da expressão desta enzima. A supressão da atividade da AGAT permite o aumento da disponibilidade da L-arginina para outras vias metabólicas, como para a síntese de NO (DERAIVE et al., 2004; JAHANGIR et al., 2009; HAINES; PENDLETON; EICHLER, 2011).

Levando em consideração os dados acima, é provável que a administração concomitante de creatina e L-arginina promoveu o aumento da biodisponibilidade de creatina e NO. Desta forma, pode-se supor que tanto o aumento de creatina quanto de NO cerebral contribuíram no desempenho destes animais.

Estudos vêm mostrando o envolvimento do sistema Cr/PCr/CK em processos cognitivos como memória e aprendizado em humanos e roedores. Camundongos que apresentam *knockout* das isoformas BB-CK citosólicas cerebrais apresentam dificuldades de aprendizagem no LAM (JOST et al., 2002) e aqueles com *knockout* das isoformas BB-CK e uMt-CK mostram prejuízos severos de aprendizagem espacial acompanhados de redução do peso corporal e cerebral e diminuição do tamanho hipocampal (STREIJGER et al., 2005).

A estimulação da memória de idosos aumenta os sinais de creatina e fosfocreatina no hipocampo (VALENZUELA et al., 2003). A suplementação com creatina promoveu redução da fadiga mental em sujeitos submetidos a cálculos matemáticos sucessivos simples (WATANABE; KATO; KATO, 2002) e melhorou a memória de sujeitos vegetarianos (BENTON; DONOHOE, 2011).

Além da participação no metabolismo energético cerebral, dados recentes mostram que a creatina também pode ser liberada via excitose dependente de potencial de ação, agindo assim como um neuromodulador no cérebro (ALMEIDA et al., 2006). Estudos mostram que a creatina modula sítios de poliaminas em

receptores NMDA, promovendo melhora da memória espacial de ratos (OLIVEIRA et al., 2008; ROYES et al., 2008). Mais recentemente pesquisadores descobriram que a facilitação do aprendizado espacial mediada pela creatina envolve a via de sinalização intracelular CaMKII/CREB (proteínas cinases dependentes de Ca^{+2} /calmodulina II) / (proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc) hipocampais (SOUZA et al., 2012).

As enzimas Na^{+} , K^{+} - ATPases hipocampais estão envolvidas com o aprendizado e memória espacial, e condições que levam a alterações na estrutura ou funcionamento destas enzimas comprometem o desempenho de roedores no labirinto aquático de Morris (ZHAN et al., 2004; VASCONCELLOS et al., 2005; MOSELEY et al., 2007). A administração intrahipocampal de creatina aumenta a atividade das enzimas Na^{+} , K^{+} - ATPases em ratos, e envolve um mecanismo vinculado à neuromodulação de receptores glutamatérgicos NMDA e ativação intracelular de calcineurinas (RAMBO et al., 2012).

A via L-arginina-NO também está envolvida com a memória espacial (PAUL; EKAMBARAM, 2011). É extensivamente reconhecido que a ativação de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo NMDA promove uma cascata de eventos intercelulares que resulta na formação de NO, que atua como mensageiro retrógrado coordenando o reforçamento de mecanismos moleculares envolvidos em formas de plasticidade sináptica, como o LTP, um correlato molecular de processos de aprendizagem e memória, bastante evidente em regiões cerebrais como córtex cerebral e hipocampo (ESPLUGUES, 2002).

A aplicação de L-arginina neutraliza os prejuízos ocasionados por 7-nitroindazole (7-NI) na memória espacial de ratos (YILDIZ et al., 2009). Contrariamente, pesquisas revelaram que o excesso de NO produzido em decorrência da administração aguda de L-arginina pode gerar radicais livres que prejudicam a atividade das enzimas Na^{+} , K^{+} - ATPases hipocampais, promovendo déficits de memória espacial em ratos (WYSE et al., 2001; REIS et al., 2002).

O modelo de estresse crônico utilizado não provocou alterações na memória espacial de trabalho nos animais, contrariando estudos anteriores como o de Tagliari et al. (2011). Os hormônios do estresse podem prejudicar processos cognitivos dependentes do córtex pré-frontal, como a memória de trabalho (YUEN et al., 2009; DEVILBISS; JENISON; BERRIDGE, 2012). No presente estudo, é possível que o

modelo de estresse utilizado tenha sido menos intenso que o utilizado por Tagliari et al. (2011).

Pesquisadores afirmam que a real ação dos hormônios do estresse sobre as funções sinápticas do córtex pré-frontal ainda precisa ser elucidado. Dados têm mostrado que o estresse leve a moderado pode melhorar a aprendizagem e memória, particularmente em função dos glicocorticóides (SAPOLSKY, 2004; JOËLS et al., 2006). O estresse agudo pode melhorar a transmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal melhorando a memória espacial de trabalho em ratos (YUEN et al., 2009).

Existem estudos que mostram os efeitos negativos do estresse crônico na memória de trabalho. Entretanto, os déficits neste parâmetro podem ser transitórios e mais difíceis de detectar em comparação aos déficits causados pelo estresse crônico na memória de referência (CONRAD, 2010).

A administração de creatina melhorou significativamente a memória espacial de trabalho dos animais. Estudos clínicos mostram que a suplementação com creatina melhora a memória de trabalho e inteligência de indivíduos vegetarianos saudáveis (RAE et al., 2003). Idosos com aproximadamente 76 anos de idade apresentaram melhora em tarefas de memória espacial de trabalho em função da suplementação diária com esta substância por uma semana (McMORRIS et al., 2007b).

Em condições de estresse, a creatina também se mostrou efetiva para melhorar o funcionamento cognitivo (ANDRES et al., 2008). McMorris et al. (2006) observaram que a suplementação com creatina melhora as funções executivas e a memória de trabalho de sujeitos submetidos a estados de privação de sono e exercícios físicos moderados.

A coadministração de L-arginina e creatina também mostrou um efeito positivo na memória de trabalho, evidenciado nas 4^{as} tentativas do teste. Assim como o sistema Cr/PCr/CK, a via L-arginina-NO também apresenta relação com a memória espacial de trabalho. Em ratos, os processos que envolvem a inibição da NOS hipocampal estão correlacionados com prejuízos de memória espacial de trabalho (OHNO; YAMAMOTO; WATANABE, 1993). Em um estudo recente, Zoubovsky et al. (2011) reportaram pela primeira vez que os déficits de memória espacial de trabalho em camundongos vinculam-se à deleção do gene que codifica a isoenzima nNOS no córtex pré-frontal.

Pesquisadores observaram que ratos adultos induzidos à isquemia cerebral transitória apresentam prejuízos de memória espacial de trabalho no labirinto de Barnes em função da perda acentuada de neurônios da camada CA1 do hipocampo dorsal. Estes animais apresentam melhora cognitiva quando recebem injeção única de darbepoetina alfa, a qual também aumenta os níveis de NOx no hipocampo ventral, efeitos anulados pela administração de L-NAME. Desta forma, é provável que a melhora induzida pela darbepoetina esteja vinculada ao aumento da atividade das NOS hipocampais, as quais estão implicadas com a plasticidade sináptica (SAMSON; KAJITANI; ROBERTSON, 2010).

Considerando os resultados desta pesquisa, pode-se concluir que o protocolo de treinamento (aquisição da memória) não proporcionou aprendizado espacial nos animais do grupo Ct. Contudo, verificou-se que a coadministração de L-arginina e creatina foi capaz de habilitar a ocorrência do aprendizado espacial, um efeito possivelmente associado com a maior produção de creatina e NO. A memória espacial de trabalho foi significativamente melhorada com a administração isolada de creatina.

Referências

As referências citadas neste capítulo encontram-se ao final da dissertação na sessão de Referências Bibliográficas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, nutricionais e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado. A partir da análise dos resultados, obteve-se as seguintes conclusões:

- O modelo de estresse crônico empregado foi eficaz, pois os animais do grupo Ec, mesmo consumindo maior quantidade de ração e água, tiveram menor ganho de peso corporal e hepático e apresentaram outros marcadores biológicos importantes do estresse crônico, como níveis plasmáticos de glicose elevados.
- Os animais do grupo Ec também apresentaram ansiedade no LCE e atividade locomotora reduzida no CA.
- Nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir o impacto do estresse no consumo de ração/água e glicemia, porém todos foram eficazes para melhorar a atividade locomotora no CA e aumentar o consumo de alimentos palatáveis (Froot Loops®).
- O tratamento com L-arginina promoveu hipertrofia cardíaca nos animais.
- O tratamento com creatina diminuiu o peso relativo da glândula adrenal esquerda, preveniu a perda de peso corporal e hepático e melhorou o desempenho dos animais no teste de memória espacial de trabalho.
- A coadministração de L-arginina e creatina mostrou-se eficaz em bloquear os efeitos do estresse na perda de tecido adiposo, diminuiu o peso da glândula adrenal e bloqueou a hipertrofia cardíaca vinculada a administração de L-arginina.
- A coadministração de L-arginina e creatina reduziu potencialmente a ansiedade induzida pelo estresse no LCE e habilitou a ocorrência do aprendizado espacial em um protocolo de treinamento que não proporcionou aprendizado nos animais Ct.

Em síntese, pode-se afirmar que a coadministração de L-arginina e creatina é o tratamento mais eficaz, pois proporcionou resultados positivos em todos os parâmetros comportamentais avaliados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, T. C.; EPEL, E. S. Stress, eating and the reward system. **Physiol Behav**, v. 91, n. 4, p. 449-58, Jul. 2007.

ADHIHETTY, P. J.; BEAL, M. F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases, **Neuromolecular Med**, v. 10, n. 4, p. 275-90, Nov. 2008.

ALLEN, P. J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 5, p. 1442-62, May. 2012.

ALLEN, P. J. et al. Chronic creatine supplementation alters depression-like behavior in rodents in a sex-dependent manner. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 534-46, Jan. 2010.

ALMEIDA, L. S. et al. Exocytotic release of creatine in rat brain. **Synapse**, v. 60, n. 2, p. 118-23, Aug. 2006.

AMITAL, D. et al. Observed effects of creatine monohydrate in a patient with depression and fibromyalgia. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 10, p. 1840-1, Oct. 2006a.

AMITAL, D. et al. Open study of creatine monohydrate in treatment-resistant posttraumatic stress disorder, **J Clin Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 836-37, May. 2006b.

ANAND, R.; KAVITA, G.; RAY, A. Pharmacological evidence for the role of nitric oxide in the modulation of stress-induced anxiety by morphine in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 676, n. 1-3, p. 71-4, Feb. 2012.

ANDREASSEN, O. A. et al. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, v. 8, n. 3, p. 479-91, Jun. 2001.

ANDRES, R. H. et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Res Bull**, v. 76, n. 4, p. 329-43, Jul. 2008.

ANDREWS, R. et al. The effect of dietary creatine supplementation on skeletal muscle metabolism in congestive heart failure. **Eur Heart J**, v. 19, n. 4, p. 617-22, Apr. 1998.

ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin Sci (Lond)**, v. 96, n. 5, p. 513-23, May. 1999.

AZPIROZ, A. et al. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 345-61, Apr. 1999.

BANERJEE, R. et al. Effect of chronic mild stress on brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat hippocampus. **Neuroscience Research Letters**, v. 3, n. 1, p. 29-34, 2012.

BAUER, M. E. Estresse: como ele abala as defesas do organismo. **Ciência Hoje**, v. 3, n. 179, p. 20-5, 2002.

BECKMAN, J. S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: LANCASTER, J. **Nitric Oxide Principles and Actions**. San Diego: Academic Press, 1996.

BENDER, A. et al. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo controlled randomized pilot trial. **Neurology**, v. 67, n. 7, p. 1262-4, Oct. 2006.

BENTON, D.; DONOHOE, R. The influence of creatine supplementation on the cognitive functioning of vegetarians and omnivores. **Br J Nutr**, v. 105, n. 7, p. 1100-5, Apr. 2011.

BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. **J Nutr**, v. 137, n. 6, p. 1650-5, Jun. 2007.

BÖGER, R. H.; BODE-BÖGER, S. M. The clinical pharmacology of L-arginine. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 79-99, 2001.

BOGGIANO, M. N. et al. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: An animal model of lean vs. obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 9, p. 1357-67, Sep. 2007.

BONDI, C. O. et al. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 320-31, Jan. 2008.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety - relationship and cellular pathways. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, n. 2, p. 63-7, Apr./Jun. 2009.

BREWER, G. J.; WALLIMANN, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons, **J Neurochem**, v. 74, n. 5, p. 1968-78, May. 2000.

BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. Estresse crônico melhora a função miocárdica sem alterar a atividade do canal-L para Ca^{+2} em ratos. **Arq Bras Cardiol**, v. 99, n. 4, p. 1-8, 2012.

BÜRKLEN, T. S. et al. The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's Disease: CK inactivation, APP-CK complexes, and focal creatine deposits. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2006, n. 3, p. 1-11, 2006.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 766-75, Oct. 2007.

CALAPAI, G. et al. Evidence that nitric oxide modulates drinking behavior. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 8, p. 761-4, Aug. 1992.

CALAPAI, G. et al. Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. **J Clin Invest**, v. 104, n. 7, p. 975-82, Oct. 1999.

CALVEZ, J. et al. Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 675-83, Oct. 2011.

CAMPBELL, B. I.; LA BOUNTY, P. M.; ROBERTS, M. The ergogenic potential of arginine. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 1, n. 2, p. 35-8, Dec. 2004.

CAMPEAU, S. et al. Principles of Psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clin North Am**, v. 21, n. 2, p. 259-76, Jun. 1998.

CARDOSO, L. R. D.; BANACO, R. A. Efeitos do esquema de intervalo variável no desenvolvimento de anedonia induzida por estresse crônico moderado em ratos. **Revista Brasileira de Análise do Comportamento/Brazilian Journal of Behavior Analysis**, v. 5, n. 1, p. 79-96, 2009.

CHIDA, Y. et al. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5, n. 8, p. 466-75, Aug. 2008.

CHIYODA, A. et al. Efeito da suplementação oral de arginina sobre a secreção de GH e metabolismo de lipídios em ratos Wistar treinados. **Motricidade**, v. 5, n. 4, p. 1-11, 2009.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 7, p. 374-81, Jun. 2009.

CLARK, J. F. Creatine: A review of its nutritional applications in sport. **Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 322-4, Mar. 1998.

COHEN, S. et al. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.109, n.16, p. 5995-9, Apr. 2012.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, v. 129, n. (Pt7), p. 1659-73, Jul. 2006.

CONRAD, C. D. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 742-55, Jun. 2010.

CONRAD, C. D. et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. **Behav Neurosci**, v. 110, n. 6, p. 1321-34, Dec. 1996.

CONWAY, M. A.; CLARK, J. F. **Creatine and creatine phosphate: Scientific and clinical perspectives**. San Diego: Academic Press, 1996.

COSTOLI, T. et al. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 6, p. 2133-40, Jun. 2004.

CREMA, L. et al. Na(+), K(+) - ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. **Neurochem Res**, v. 35, n. 11, p. 1787-95, Nov. 2010.

CUNHA, M. P. et al. Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 11, p. 1489-501, Nov. 2012.

CZÉH, B. et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 22, p. 12796-801, Oct. 2001.

CYMERYNG, C. B.; DADA, L. A.; PODESTÁ, E. J. Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis. **J Endocrinol**, v. 158, n. 2, p. 197-203, Aug. 1998.

CYMERYNG, C. B. et al. Effects of L-arginine in rat adrenal cells: involvement of nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 2962-7, Jul. 1999.

DALGALARRONDO, Paulo. **Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

D'AQUILA, P. S. et al. Exploratory behavior and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. **Eur J Pharmacol**, v.399, n. 1, p. 43-7, Jun. 2000.

DEDEOGLU, A. et al. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. **J Neurochem**, v. 85, n. 6, p. 1359-67, Jun. 2003.

DEMANT, T. W.; RHODES, E. C. Effects of Creatine Supplementation on Exercise Performance, **Sports Med**, v. 28, n. 1, p. 49-60, Jun. 1999.

DERAVE, W. et al. Plasma guanidino compounds are altered by oral creatine supplementation in healthy humans. **J Appl Physiol**, v. 97, n. 3, p. 852-7, Sep. 2004.

DEVILBISS, D. M.; JENISON, R. L.; BERRIDGE, C. W. Stress-induced impairment of a working memory task: role of spiking rate and spiking history predicted discharge. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 9, 2012.

DIANE, A. et al. Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. **Appetite**, v. 50, n. 2-3, p. 397-407, Mar./May. 2008.

ELY, D. R. et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiol Behav**, v. 61, n. 3, p. 395-8, Mar. 1997.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signaling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 5, p. 1079-95, Mar. 2002.

FARR, S. A. et al. Orexin-A-induced feeding is dependent on nitric oxide. **Peptides**, v. 26, n. 5, p. 759-65, May. 2005.

FENNING, A. et al. L-arginine attenuates cardiovascular impairment in DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiology. Heart Circ Physiol**, v. 289, p. 1408-16, Oct. 2005.

FERRANTE, R. J. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 4389-97, Jun. 2000.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, Jul. 1998.

FLORA FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000.

FRANCHINI, K. G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 125-42, 2001.

FRANCI, C R. Estresse: processos adaptativos e não-adaptativos. In: ANTUNES, J. R.; MOREIRA A. C.; ELIAS L. L. K.; CASTRO M. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FRANCO, F. S. C. et al. Efeitos da suplementação de creatina e do treinamento de potência sobre a performance e a massa corporal magra de ratos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 5, Set./Out. 2007.

GALBRAITH, R. A.; FURUKAWA, M.; LI, M. Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. **Brain Res**, v. 1101, n. 1, p. 85-91, Jul. 2006.

GAMARO, G. D. et al. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochem Int**, v. 42, n. 2, p. 107-14, Jan. 2003a.

GAMARO, G. D. et al. Reduction of hippocampal Na(+), K(+)-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Res**, v. 28, n. 9, p. 1339-44, Sep. 2003b.

GASKIN, F. S. et al. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 913-8, Jun. 2003.

GEORGE, S. A. et al. CRH-stimulated cortisol release and food intake in healthy, nonobese adults. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 607-12, May. 2010.

- GIORDDANO, M. et al. Nitric oxide synthase inhibitors enhance plasma levels of corticosterone and ACTH. **Acta Physiol Scand**, v. 157, p. 259-64, Jun. 1996.
- GIUDICE, M. D.; ELLIS, B. J.; SHIRTCLIFF, E. A. The adaptive calibration model of stress responsivity. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 7, p. 1562-92, Jun. 2011.
- GOSWAMI, S. et al. A rat model of post-traumatic stress disorder reproduces the hippocampal deficits seen in the human syndrome. **Front Behav Neurosci**, v. 6, n. 26, p. 1-8, Jun. 2012.
- GREENO, G. G.; WING, R. R. Stress-induced eating. **Psychol Bull**, v. 115, p. 444-64, May. 1994.
- GROENEVELD, G. J. et al. A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**, v. 53, n. 4, p. 437-45, Apr. 2003.
- GUERRA, G. P. et al. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 186, n. 2, p. 150-8, Jun. 2006.
- GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-52, Jun. 2005.
- GULATI, K.; MASSOD, A.; VIJAYAN, V. K. Involvement of nitric oxide (NO) in the regulation of stress susceptibility and adaptation in rats. **Indian J Exp Biol**, v. 44, n. 10, p. 809-15, Oct. 2006.
- GULATI, K.; CHAKRABORTI, A.; RAY, A. Differential role of nitric oxide (NO) in acute and chronic stress induced neurobehavioral modulation and oxidative injury in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, p. 272-6, Apr. 2009.
- GUPTA, V. et al. Anti-stress and adaptogenic activity of L-arginine supplementation. **Evid Complement Alternat Med**, v. 2, n. 1, p. 93-7, Dec. 2005.
- HAINES, R. J.; PENDLETON, L. C.; EICHLER, D. C. Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. **Int J Biochem Mol Biol**, v. 2, n. 1, p. 8-23, 2011.
- HELMREICH, D. L.; TYLEE, D. Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. **Horm Behav**, v. 60, n. 3, p. 284-91, Aug. 2011.
- HENCKENS, M. J. et al. Stressed memories: how acute stress affects memory formation in humans. **J Neurosci**, v. 29, n. 32, p. 10111-9, Aug. 2009.
- HERMAN, J. P. et al. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 292-8, Apr. 2012.
- HERSCH, S. M. et al. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. **Neurology**, v. 66, n. 2, p. 250-2, Jan. 2006.

HUA, Y. et al. DETA/NONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 200, n. 2, p. 231-42, Oct. 2008.

HUANG, E. P. Synaptic plasticity: a role of for nitric oxide LTP. **Curr Biol.**, v. 7, n. 3, p. 141-3, Mar. 1997.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25, suppl. 2, p. 46-51, 2003.

JACOBS, G. D. The Physiology of Mind-Body Interactions: The Stress Response and the Relaxation Response. **J Altern Complement Med**, v. 7, suppl.1, p. 83-92, 2001.

JACHIMOWICZ, A.; HOLY, Z.; WISNIEWSKI, K. The participation of nitric oxide in the facilitator effect of arginine vasopressin on memory. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 58, n. 1, p. 37-45, 1998.

JAHANGIR, E. et al. The effect of L-arginine and creatine on vascular function and homocysteine metabolism. **Vasc Med**, v. 14, n. 3, p. 239-48, Aug. 2009.

JÖELS, M. et al. Learning under stress: How does it work? **Trends Cog Sci**, v. 10, n. 4, p. 152-8, Apr. 2006.

JOST, C. R. et al. Creatine kinase B driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behavior, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 1692-706, May. 2002.

JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, n. 3, p. 189-201, 2004.

KALE, M. K.; BHUSARI, K. P.; UMATHE, S. N. Influence of various stressors on the thyroid function and to set up its correlation with the markers of oxidative stress in blood. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, n. 4, p. 351-65, 2011.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural sciences**. 3. ed. New York: Elsevier, 1991.

KAPTSAN, A. et al. Lack of efficacy of 5 grams daily of creatine in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Psychiatry**, v. 68, n. 6, p. 881-4, Jun. 2007.

KATO, T. Molecular neurobiology of bipolar disorder: a disease of mood stabilizing neurons? **Trends Neurosci**, v. 31, n. 10, p. 495-503, Oct. 2008.

KATZ, R. J. Animal model of depression: effects of electroconvulsive shock therapy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 5, n. 2, p. 273-7, 1981.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; CARROL, J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 5, n. 2, p. 247-51, 1981.

KELLY, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. **Altern Med Rev**, v. 5, n. 4, p. 306-33, Aug. 2000.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 6, p. 453-62, Jun. 2002.

KLEEN, J. K. et al. Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. **Behav Neurosci**, v. 120, n. 4, p. 842-51, Aug. 2006.

KLIVENYI, P. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **Nat Med**, v. 5, n. 3, p. 347-50, Mar. 1999.

KNOX, D. et al. Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex. **Neurosci Lett**, v. 480, n. 1, p. 16–20, Aug. 2010.

KOGA, Y. et al. Brain creatine functions to attenuate acute stress responses through GABAergic system in chicks. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 65-71, 2005.

KONARSKA, M.; STEWART, R. E.; McCARTY, R. Predictability of chronic intermittent stress: Effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. **Behav Neural Biol**, v. 53, n. 2, p. 231-243, Mar. 1990.

KORTE, S. M. et al. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 1, p. 3-38, Feb. 2005.

KREIDER, R. B. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. **Mol Cell Biochem**, v. 244, n. 1-2, p. 89-94, Feb. 2003.

KREIDER, R. B.; JUNG, Y. P. Creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 53-69, 2011.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct. 2008.

KUMAR, A. Long-term potentiation at CA3-CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress. **Front Aging Neurosci**, v. 3, p. 1-20, 2011.

KUMARAN, D.; MAGUIRE, E. A. The human hippocampus: cognitive maps or relational memory? **J Neurosci**, v. 25, n. 31, p. 7254-9, Aug. 2005.

KUO, L. E. et al. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. **Ann NY Acad Sci**, v. 1148, p. 232-237, 2008.

KUTZ, M. R.; GUNTER, M. J. Creatine monohydrate supplementation on body weight and percent body fat. **J Strength Cond Res**. v. 17, n. 4, p. 817-21, Nov. 2003.

LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 1, p. 45-54, Jan. 2004.

LAWLER, J. M. et al. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 290, n. 1, p. 47-52, Jan. 2002.

LECHIN, F. et al. The effects of oral arginine on neuroautonomic parameters in healthy subjects. **The Journal of Applied Research**, v. 6, n. 3, 2006.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

LENT, R. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LEONELLI, M., TORRÃO, A. S.; BRITTO, L. R. G. Unconventional neurotransmitters, neurodegeneration and neuroprotection. **Braz J Med Bio Res**, v. 42, n.1, p. 68-75, Jan. 2009.

LI, T.; WANG, N.; ZHAO, M. Neuroprotective effect of phosphocreatine on focal cerebral ischemia-reperfusion injury. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LI, Z. et al. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 873-87, Dec. 2004.

LIANG, M.; KNOX, F. G. Nitric oxide activates PKC alpha and inhibits Na(+), K(+)-ATPase in opossum kidney cells. **Am J Physiol**, v.277, n. (6Pt2), p. 859-65, Dec. 1999.

LIPP, M. E. N. Stress: evolução conceitual. In: LIPP, M. E. N. (Org.). **Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas**. São Paulo: Casado Psicólogo, 2003.

LIPP, M. E. N.; MALAGRIS, L. E. N. Manejo do estresse. In: RANGÉ, B (Org.). **Psicoterapia comportamental e cognitiva: pesquisa, aplicações e problemas**. Campinas: Livro Pleno, 2001.

LUCCA, G. C. et al. Chronic mild stress paradigm reduces sweet food intake in rats without affecting brain derived neurotrophic factor protein levels. **Curr Neurovasc Res**, v. 5, n. 4, p. 207-13, Nov. 2008.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M.; DEUTZ, N. E. P. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 1, p. 97-104, Jan. 2010.

LUINE, V. V.; VILLEGAS, M. M.; McEWEN, B. S. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. **Brain Res**, v. 639, n. 1, p. 167-70, Mar. 1994.

LUPIEN, S. J. et al. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. **Brain Cogn**, v. 65, n. 3, p. 209-37, Dec. 2007.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiol Rev**, v.84, n.1, p. 87-136, Jan. 2004.

LYOO, I. K. et al. A Randomized, double-blind placebo-controlled trial of oral creatine monohydrate augmentation for enhanced response to a selective serotonin reuptake inhibitor in women with major depressive disorder. **Am J Psychiatry**, v. 169, n. 9, p. 937-45, Sep. 2012.

MADRIGAL, J. L. et al. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 420-9, Apr. 2001.

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 89-98, Nov. 1995.

MAGNI, D. V. et al. Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. **Brain Res**, v. 1185, p. 336-345, Dec. 2007.

MANNS, J. R.; EICHENBAUM, H. A cognitive map for object memory in the hippocampus. **Learn Mem**, v. 16, n. 10, p. 616-24, Sep. 2009.

MASCI, C. **A hora da virada: enfrentando os desafios da vida com equilíbrio e serenidade**. São Paulo: Saraiva, 2001.

MASSOD, A. et al. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 458, n. 1-2, p. 135-9, Jan. 2003.

MASSOD, A. et al. Pharmacological and biochemical studies on the possible role of nitric oxide in stress adaptation in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 493, n. 1-3, p. 111-5, Jun. 2004.

MASTORAKOS, G. et al. Exercise and the stress system. **Hormones (Athens)**, v. 4, n. 2, p. 73-89, Apr./Jun. 2005.

MATSUOKA, H. et al. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 27, p. 14-8, Jan. 1996.

MATTHEWS R. T. et al. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. **Exp Neurol**, v. 157, n. 1, p. 142-9, May. 1999.

MATUSZEWSKI, L. et al. The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. **Physiol Behav**, v. 90, n. 4, p. 674-81, Mar. 2007.

MAULIK, S. K.; KUMAR, S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. **Toxicol Mech Methods**, v. 22, n. 5, p. 359-66, Jun. 2012.

McEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci.**, v. 22, p. 105-22, 1999.

McEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 172-89, Dec. 2000.

McLAY, R. N.; FREEMAN, S. M.; ZADINA, J. E. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. **Physiol Behav**, v. 63, n. 5, p. 933-7, Mar. 1998.

McMORRIS, T. et al. Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 21-8, Jan. 2007a.

McMORRIS, T. et al. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. **Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn**, v. 14, n. 5, p. 517-28, 2007b.

McMORRIS, T. et al. Effect of creatine supplementation and sleep deprivation, with mild exercise, on cognitive and psychomotor performance, mood state, and plasma concentrations of catecholamines and cortisol. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 186, n. 1, p. 93-103, Mar. 2006.

MELLO, D. M. et al. Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P. **Behav Brain Res**, v. 181, n. 2, p. 232-8, Aug. 2007.

MELLO, P. B. et al. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **An Acad Bras Cienc**, v. 80, n. 2, p. 301-9, 2008

MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. Creatina: o suplemento nutricional para a atividade física - conceitos atuais. **ALAN**, v. 52, n. 2, p. 1-19, Jun. 2002.

MIKA, A. et al. Chronic stress impairs prefrontal cortex-dependent response inhibition and spatial working memory. **Behav Neurosci**, v. 126, n. 5, p. 605-19, Oct. 2012.

MILLER, G. E.; CHEN, E.; PARKER, K. J. Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging: moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. **Psychol Bull**, v. 137, n. 6, p. 959-97, Nov. 2011.

- MIYOSHI, E. et al. Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 1, p. 171-8, Jan. 2012.
- MORLEY, J. E.; FLOOD, J. F. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. **Life Sci**, v. 49, n. 10, p. 707-11, 1991.
- MORRIS JUNIOR, S. M. Arginine: beyond protein. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 508-12, Feb. 2006.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, May. 1984.
- MOSCOVITCH, M. et al. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. **J Anat**, v. 207, n. 1, p. 35-66, Jul. 2005.
- MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na(+), K(+) - ATPase α isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-26, Jan. 2007.
- MOURA, R. F. et al. Capacidade aeróbica de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 5, Sep./Out. 2008.
- MUNGRUE, I. N. et al. Cardiomyocyte over expression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. **J Clin Invest**, v. 109, n. 6, p. 735-43, Mar. 2002.
- NAGAI, T. et al. Comparisons of the skeletal muscle metabolic abnormalities in the arm and leg muscles of patients with chronic heart failure. **Circ J**, v. 68, n. 6, p. 573-9, Jun. 2004.
- NAKAZAWA, K. et al. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 361-72, May. 2004.
- NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar. 2002.
- NETTO, C. A. et al. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 69-92, May. 1993.
- NOVAES, M. R. C. G.; BEAL, F. L. R. Farmacologia da L-arginina em pacientes com câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 4, p. 321-25, 2004.
- OHNO, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. **Brain Res**, v. 632, n. 1-2, p. 36-40, Dec. 1993.

OKANO, H.; HIRANO, T.; BALABAN, E. Learning and memory. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 23, p. 12403-4, Nov. 2000.

OLIVEIRA, M. S. et al. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 1, p. 200-4, Feb. 2008.

OWEN, L.; SUNRAM-LEA, S. Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: A review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and l-carnitine. **Nutrients**, v. 3, n. 8, p. 735-55, Aug. 2011.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. **Endocr Rev**, v. 22, n. 4, p. 502-48, Aug. 2001.

PADDON-JONES, D.; BØRSHEIM, E.; WOLFE, R. R. Potential ergogenic effects of arginine and creatine supplementation. **J Nutr**, v. 134, p. 2888-94, Oct. 2004.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 1, p. 79-83, Jan. 2000.

PALMA, B. D. et al. Repercussões imunológicas dos distúrbios do sono: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como fator modulador. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, p. 33-8, 2007.

PALUMBO, M. L. et al. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. **J Neurochem**, v. 102, n. 1, p. 261-74, Jul. 2007.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: Attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 104, n. 2, p. 225-9, 1991.

PARKER, K. J.; SCHATZBERG, A. F.; LYONS, D. M. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. **Horm Behav**, v. 43, n. 1, p. 60-6, Jan. 2003.

PAUL, V.; EKAMBARAM, P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. **Indian J Med Res**, v. 133, p. 471-8, May. 2011.

PECKETT, A. J.; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, v. 60, n. 11, p. 1500-10, Nov. 2011.

PELLOW, S. et al. Validation of open closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 140-67, Aug. 1985.

PEREIRA, D. M. **Efeito da creatina sobre as mensurações eletrocardiográficas de equinos treinados em esteira rolante**. 2006, 73f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A. Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 161-76, Jun. 2001.

PETTENUZZO, L. F. et al. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. **Physiol Behav**, v. 95, n. 3, p. 295-301, Oct. 2008.

PHILLIPS, M. I. Functions of angiotensin in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v. 49, p. 413-35, 1987.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.**, v. 47, n. 4, p. 379-91, Feb. 1978.

PRASS, K. et al. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 3, p. 452-9, Mar. 2007.

PRESTES, J. et al. Metabolismo lipídico: suplementação e performance humana. **Saúde Rev**, v. 8, n. 18, p. 49-54, 2006.

RAE, C. et al. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo controlled, cross-over trial. **Proc Biol Sci**, v. 270, n. 1529, p. 2147-50, Oct. 2003.

RAMBO, L. M. et al. Creatine increases hippocampal Na(+),K(+) -ATPase activity via NMDA-calcineurin pathway. **Brain Res Bull**, v. 88, n. 6, p. 553-9, Sep. 2012.

RAWSON, E. S. et al. Creatine supplementation does not improve cognitive function in young adults. **Physiol Behav**, v. 95, n. 1-2, p. 130-4, Sep. 2008.

REGUNATHAN, S. Agmatine: biological role and therapeutic potentials in morphine analgesia and dependence. **AAPS J**, v. 8, n. 3, p. 479-84, Sep. 2006.

REIS, E. A. dos. et al. Arginine administration inhibits hippocampal Na(+), K(+) -ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Res**, v. 951, n. 2, p. 151-7, Oct. 2002.

REZIN, G. T. et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Int**, v. 53, n. 6-8, p. 395-400, Dec. 2008.

RIBEIRO, C. A. et al. Creatine administration prevents Na(+),K(+) -ATPase inhibition induced by intracerebroventricular administration of isovaleric acid in cerebral cortex of young rats. **Brain Res**, v. 1262, p. 81-8, Mar. 2009.

RIBEIRO, C. A. et al. Isovaleric acid reduces Na(+), K(+) -ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 27, n. 4, p. 529-40, Jun. 2007

ROITMAN, S. et al. Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study. **Bipolar Disord**, v. 9, n. 7, p. 754-8, Nov. 2007.

ROSE'MEYER, R. R. et al. Chronic dietary L-arginine down-regulates adenosine receptor and NO synthase expression in rat heart. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102, n. 5, p. 459-65, May. 2008.

ROSSATO, J. I. et al. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learn Mem**, v. 13, n. 4, p. 431-40, Jul./Ago. 2006.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem**, v. 14, n. 1-2, p. 36-46, Jan./Feb. 2007.

ROYES, L. F. F. et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 118, n. 4, p. 1079-90, 2003.

ROYES, L. F. F. et al. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: Role of NMDA receptors. **Neurochem Int**, v. 53, n. 1-2, p. 33-37, Jun. 2008.

RYGULA, R. et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 127-34, Jul. 2005.

RYU, H. et al. The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. **Pharmacol Ther**, v. 108, n. 2, p. 193-207, Nov. 2005.

SAKELLARIS, G. et al. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **J Trauma**, v. 61, n. 2, p. 322-9, Aug. 2006.

SAMSON, M. L.; KAJITANI, K.; ROBERTSON, G. S. Nitric-oxide synthase mediates the ability of darbepoetin alfa to attenuate pre-existing spatial working memory deficits in rats subjected to transient global ischemia. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 333, n. 2, p. 437-44, May. 2010.

SANDSTROM, N. J.; HART, S. R. Isolation stress during the third postnatal week alters radial arm maze performance and corticosterone levels in adulthood. **Behav Brain Res**, v. 156, n. 2, p. 289-96, Jan. 2005.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 925-35, Oct. 2000.

SAPOLSKY, R. M. Stress and plasticity in the limbic system. **Neurochem Res**, v. 28, n. 11, p. 1735-42, Nov. 2003.

SAPOLSKY, R. M. **Why the zebras don't get ulcers**. 3. ed. New York: Holt Paperbacks, 2004.

SARAIVA, A. L. et al. Creatine reduces oxidative stress markers but does not protect against seizure susceptibility after severe traumatic brain injury. **Brain Res Bull.** v. 87, n. 2-3, p. 180-6, Feb. 2012.

SASSE, S. K. et al. Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. **Stress**, v. 11, n. 6, p. 425-37, Nov. 2008.

SCHUCK, P. F. et al. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochem Int**, v. 45, n. 5, p. 661-7, Oct. 2004.

SCHWEIZER, M. C.; HENNIGER, M. S. H.; SILLABER, I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009.

SEIFRIED, H. E. Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention? **J Nutr Biochem**, v. 18, n. 3, p. 168-71, Mar. 2007.

SELYE, H. FORTIER, C. Adaptive reaction to stress. **Psychosom Med**, v. 12, n. 3, p. 149-157, May./Jun. 1950.

SEMENOFF-SEGUNDO, A. et al. Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 1, p. 66-72, Jan. 2012.

SESTILI, P. et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 5, p. 837-49, Mar. 2006.

SHAO, L. et al. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. **Ann Med**, v. 40, n. 4, p.281-95, 2008.

SHEFNER, J. M. et al. A clinical trial of creatine in ALS. **Neurology**, v. 63, n. 9, p. 1656-61, Nov. 2004.

SILVA, W. C. da. et al. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, v. 18, n. 1, p. 29-39, 2008.

SILVEIRA, P. P. et al. Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 11, p. 1343-50, Nov. 2000.

SKØTT, O. Angiotensin II and control of sodium and water intake in the mouse. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284, n. 6, p. 1380-1, Jun. 2003.

SMRIGA, M. et al. Oral treatment with L-lysine and L-arginine reduces anxiety and basal cortisol levels in healthy humans. **Biomed Res**, v. 28, n. 2, p. 85-90, Apr. 2007.

SOUZA, M. A. et al. Involvement of hippocampal CAMKII/CREB signaling in the spatial memory retention induced by creatine. **Amino Acids**, v. 43, n. 6, p. 2491-503, Dec. 2012.

SOUZA, N. et al. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, v. 97, n. 2, p. 253-66, 2000.

SQUADRITO, F. et al. Anorectic activity of NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in Sucker rats. **Eur J Pharmacol**, v. 230, n. 1, p. 125-8, Jan. 1993.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 24, p. 13515-22, Nov. 1996.

STEWART, C. A, MORRIS, R. G. M. The watermaze. In: SAHGAL, A. (Ed.). **Behavioral neuroscience. A practical approach**. Oxford: IRL Press, 1993.

STREIJGER, F. et al. Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinases BCK and UbCKmit, **Behav Brain Res**, v. 157, n. 2, p. 219-34, Feb. 2005.

STREKALOVA, T. et al. Selective effects of citalopram in the mouse model of stress-induced anhedonia with control effects for chronic stress. **Behav Pharmacol**, v. 17, n. 3, p. 271-87, May. 2006.

STREKALOVA, T. et al. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. **Behav Brain Funct**, v. 7, n. 9, Apr. 2011.

STRICKER-KRONGRAD, A.; BECK, B.; BURLET, C. Nitric oxide mediates hyperphagia of obese Zucker rats: Relation to specific changes in the microstructure of feeding behavior. **Life Sci**, v. 58, n. 1, p. 9-15, 1996.

SUCHNER, U.; HEYLAND, D. K.; PETER, K. Immunomodulatory actions of arginine in the critically ill. **Br J Nutr**, v. 87, suppl 1, p. 121-32, Jan. 2002.

SULLIVAN, P. G. et al. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury, **Ann Neurol**, v. 48, n. 5, p. 723-9, Nov. 2000.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "Letter" to the Editor of Nature, **Stress**, v. 15, n. 5, p. 472-8, Sep. 2012.

SWAAB, D. F.; BAO, A. M.; LUCASSEN, P. L. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Res Rev**, v. 4, n. 2, p. 141-94, May. 2005.

TAGLIARI, B. et al. Antioxidants prevent memory deficits provoked by chronic variable stress in rats. **Neurochem Res**, v. 36, n. 12, p. 2373-80, Dec. 2011.

TARNOPOLSKY, M. A. Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. **Subcell Biochem**, v. 46, p. 183-204, 2007.

TAWA, N. E. JR.; WARREN, M. S. Activation of intracellular protein breakdown in skeletal muscle by nitric oxide and oxygen free radicals. **Surg Forum**, v. 48, p. 30-32, 1997.

TOMIYAMA, A. J. et al. Leptin concentrations in response to acute stress predict subsequent intake of comfort foods. **Physiol Behav**, v. 107, n. 1, p. 34-9, Aug. 2012.

TORRES, I. L. S. et al. Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and on monoamine levels in different brain structures in rats. **Neurochem Res**, v. 27, n. 6, p. 519-25, Jun. 2002.

TORRES, S. J.; NOWSON, C. A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11-12, p. 887-94, Nov./Dec. 2007.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res**, v. 53, n. 4, p. 865-71, Oct. 2002.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun. 2009.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 5, p. 965-73, Nov. 2006.

UDDO, M. et al. Memory and attention in combat related posttraumatic-stress-disorder (PTSD). **J Psychopathology Behavior Assess**, v. 15, n. 1, p. 43-52, Mar. 1993.

VALENZUELA, M. J. et al. Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. **Neuroreport**, v. 14, n. 10, p. 1333-7, Jul. 2003.

VAN DER HART, M. G. C. et al. Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress-induced alterations in cerebral metabolites, cytochrome in the dentate gyrus and hippocampal volume. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 9, p. 933-41, 2002.

VASCONCELLOS, A. P. S. et al. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. **Physiol Behav**, v. 79, n. 2, p. 143-9, Jul. 2003.

VASCONCELLOS, A. P. S. de. et al. Na(+), K(+) - ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: Effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. **Neurobiol Learn Mem**, v. 84, n. 2, p. 102-10, Sep. 2005.

VASQUES, V. et al. Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. **J Neurol Sci**, v. 244, n. 1-2, p. 23-9, May. 2006.

VENHEIM, E. The effects of restraint stress on anxiety-like behavior in adolescent and adult male sprague-dawley rats: an examination of the effects of early-life stress on the development of psychopathologies. **Eukaryon**, v. 6, p. 1-13, 2010.

VYAS, A.; PILLAI, A. G.; CHATTARJI, S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. **Neuroscience**, v. 128, n. 4, p. 667-73, 2004.

ZHAN, H. et al. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. **Neurol Res**, v. 26, n. 1, p. 35-40, Jan. 2004.

ZHANG, W.; NARAYANAN, M.; FRIEDLANDER, R. M. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. **Ann Neurol**, v. 53, n. 2, p. 267-70, Feb. 2003.

ZHOU, Q. G. et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J Neurochem**, v. 103, n. 5, p. 1843-54, Dec. 2007.

ZOUBOVSKY, S. P. et al. Working memory deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice: potential impairments in prefrontal cortex mediated cognitive function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 408, n. 4, p. 707-12, May. 2011.

YAMADA, K. et al. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 5, p. 852-8, Jul. 1995.

YILDIZ, A. F. et al. Effects of L-arginine on 7-nitroindazole-induced reference and working memory performance of rats. **Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 211-8, 2009.

YOUNG, L. T. Is bipolar disorder a mitochondrial disease? **J Psychiatry Neurosci**, v. 32, n. 3, p. 160-1, May. 2007.

YOUNG, J. F. et al. Creatine-induced activation of antioxidative defence in myotube cultures revealed by explorative NMR-based metabolomics and proteomics. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 7, n. 1, p. 1-10, Feb. 2010.

YUE, Q. et al. Quantitative 3.0T MR spectroscopy reveals decreased creatine concentration in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with social anxiety disorder. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-6, Oct. 2012.

YUEN, E. Y. et al. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 33, p. 14075-9, Aug. 2009.

WALLEN W. J. Gender-differences in myocardial adaptation to afterload in normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 5, p. 774-9, Nov. 2000.

WALLIMANN, T. et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochem J**, v. 281, p. 21-40, Jan. 1992

WALKER, J. J. et al. The origin of glucocorticoid hormone oscillations. **PLoS Biol**, v. 10, n. 6, p. 1-7, Jun. 2012.

WATANABE, A.; KATO, N.; KATO, T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neurosci Res**, v. 42, n. 4, p. 279-85, Apr. 2002.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 4, p. 365-91, Jul. 2000.

WILLIAMS, M. H.; KREIDER, R. B.; BRANCH, J. D. **Creatina**. São Paulo: Manole, 2000.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-29, Dec. 1997.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 4, p. 525-34, 1992.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, n. 3, p. 358-64, 1987.

WONG, T. P. et al. Hippocampal long-term depression mediates acute stress-induced spatial memory retrieval impairment. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 27, p. 11471-6, Jul. 2007.

WRIGHT, R. L.; CONRAD, C. D. Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 1, p. 41-7, Feb. 2008.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, p. 1-17, Nov. 1998.

WU, G. et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 153-68, May. 2009.

WYSE, A. T. et al. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na(+), K(+) - ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. **Neurochem Res**, v. 26, n. 5, p. 515-20, May. 2001.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1107-213, Jul. 2000.