

## Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos

Gustavo Puggina Rogatto <sup>1</sup>  
Camila Aparecida Machado de Oliveira <sup>2</sup>  
Marcel Cardoso Faria <sup>2</sup>  
Eliete Luciano <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Investigação e Estudos sobre Metabolismo e Exercício Físico - UFMT MT

<sup>2</sup> Laboratório de Biodinâmica - Depto de Educação Física UNESP - Rio Claro

**Resumo:** Com o objetivo de verificar as respostas metabólicas agudas ao exercício físico intenso, ratos foram distribuídos em grupos repouso (REP) e exercício agudo (EA). O grupo EA foi submetido a uma sessão de exercício físico que consistiu na realização de saltos em piscina (4x10 saltos), com sobrecarga de 50% do peso corporal. Após sacrifício, amostras de sangue foram coletadas em ambas as condições experimentais para dosagem da glicose, insulina, colesterol, ácidos graxos livres (AGL) e corticosterona. Tecidos muscular, cardíaco e hepático foram utilizados para determinação das concentrações de glicogênio. A realização aguda do esforço promoveu aumento nos níveis de glicose, AGL e corticosterona. Os teores de glicogênio muscular e hepático, bem como as concentrações de insulina foram reduzidos após o exercício. Concluímos que a sessão aguda de exercício físico intermitente promoveu utilização dos estoques de carboidrato no músculo e no fígado, e favoreceu a mobilização das reservas lipídicas.

**Palavras-chave:** Exercício agudo, metabolismo, carboidratos, proteínas, corticosterona

### *Acute metabolic responses of Wistar rats to intermittent jump exercise*

**Abstract:** The purpose of the study was to verify the acute metabolic responses of rats to high intensity exercise. Rats were distributed into groups: resting (REP) and acute exercise (EA). The EA group performed an exercise session that consisted of jumps (4x10 jumps) into a swimming pool, while supporting a load of 50% of body weight. After sacrifice, blood samples were collected to determine serum glucose, insulin, cholesterol, fatty free acids, and corticosterone. The gastrocnemius muscle, heart, and liver were used to determine glycogen concentration. The acute exercise session promoted an increase of serum glucose, fatty free acids and corticosterone concentration. Muscle and liver glycogen contents, as well as serum insulin concentration, were reduced after a single exercise session. We conclude that the acute, single, high intensity exercise session promoted utilization of muscle and liver carbohydrate stores and favored consumption of the lipid sources.

**Key Words:** Acute exercise, metabolism, carbohydrate, proteins, corticosterone.

### Introdução

A atividade física é uma condição na qual ocorre um aumento da exigência de diversos sistemas orgânicos, ativando mecanismos de mobilização de substratos energéticos, e facilitando a redistribuição destes visando a manutenção do trabalho muscular.

A utilização das vias aeróbias ou anaeróbias, bem como a preferência de substrato energético a ser oxidado durante a

realização da atividade física é dependente das características do esforço desempenhado, ou seja, ocorre em função da duração, da intensidade, e/ou da frequência do exercício. Além disso, outros fatores como o nível de treinamento, o estado nutricional que o indivíduo se encontra no momento da atividade e o conteúdo inicial das reservas corporais de substrato energético também podem interferir na seqüência e na velocidade da ativação dos sistemas de fornecimento energético.

Atividades aeróbias, de longa duração e de intensidade baixa/moderada, são responsáveis pela utilização de componentes lipídicos como os ácidos graxos, o que garante a produção contínua de ATP (COYLE et al., 1997). As respostas agudas ao estímulo aeróbio, por meio do exercício físico, têm sido reportadas na literatura específica, registrando manutenção ou decréscimo dos estoques de substrato lipídico e glicídico durante a atividade em diferentes modelos experimentais (sedentarismo e treinamento, diabetes, obesidade) em humanos ou animais de laboratório (AZEVEDO, 1994; HARGREAVES, 1997; FLECK; KRAEMER, 1999; PERES et al., 1998; STEVANATO, 1999).

Modelos de exercício físico para animais de laboratório são ferramentas muito úteis do ponto de vista da investigação científica, já que facilitam a análise de componentes ou funções orgânicas difíceis de serem observadas em seres humanos em função de aspectos éticos e de saúde, permitindo assim um estudo mais profundo das respostas a diferentes estímulos, como por exemplo a atividade física. Contudo, protocolos de exercício físico anaeróbios, intermitentes e de alta intensidade para animais têm sido investigados com menor frequência que os modelos aeróbios, sendo que os poucos estudos envolvendo este tipo de atividade apresentam resultados contraditórios e inconsistentes (FLECK; KRAEMER, 1999).

Desta forma, o objetivo do atual estudo foi verificar as respostas metabólicas agudas de ratos sedentários ao estímulo agudo pelo exercício físico intenso.

### Método

#### Animais

Foram utilizados ratos machos jovens (aproximadamente 60 dias) Wistar (*Rattus Norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do Biotério Central da UNESP - Botucatu, mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro, alimentados com ração balanceada padrão (Purina) e água "ad libitum" e distribuídos em gaiolas coletivas (com 5 ratos por gaiola) à temperatura ambiente controlada de 25°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro (7:00/19:00h).

REPOUSO	(REP):	Animais mantidos em repouso no dia do sacrifício.
EXERCÍCIO AGUDO	(EA):	Animais submetidos ao exercício agudo no dia do sacrifício.

#### Protocolo de Atividade Física

Após um período de adaptação ao meio líquido (três dias, 5 minutos em tanque com água/dia), os animais do grupo EA realizaram uma sessão de atividade física que constituiu de saltos em tanque com água, com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal de cada animal, acoplado ao tórax. A sessão de exercício consistiu na realização de 4 séries de 10 saltos com 1 minuto de intervalo entre as séries (ROGATTO, 2001). A duração aproximada de cada série de saltos foi de 25 segundos.

Os saltos foram realizados em um tubo de PVC com 250mm de diâmetro (ROGATTO; LUCIANO, 2001a), visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo dessa forma o salto vertical. O tubo com fundo perfurado foi colocado em tanques de amianto com 100 cm de comprimento, 70 cm de largura, com água numa profundidade correspondente a 150% do comprimento corporal do rato (Figura 1). A contagem das repetições ocorreu cada vez que o animal se projetou em direção à superfície da água para respirar. A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do rato (AZEVEDO, 1994).

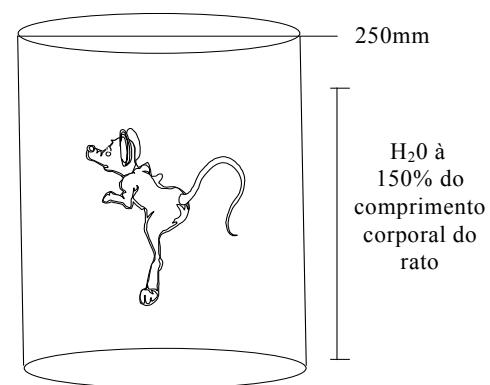


Figura 1. Instrumento para a realização de saltos em piscina (reproduzido de ROGATTO, G. P. & LUCIANO, E. *Efeitos do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de carboidratos*. Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde, v.6, n.2, p.39-46, 2001).

No momento do sacrifício os animais do grupo REP foram colocados em contato com a água, afim de se garantir o mesmo tratamento entre os grupos experimentais, minimizando diferentes respostas de estresse pela ação do contato com a água do grupo EA.

#### Sacrifício dos animais e análises bioquímicas

Os animais foram sacrificados sem jejum prévio nas condições de repouso e ao final da sessão de exercício na piscina (4 séries de 10 saltos, suportando sobrecarga equivalente à 50% da massa corporal).

O sacrifício deu-se por decapitação em guilhotina para coleta de sangue em tubos de vidro sem anticoagulante, que após 10 minutos de centrifugação à 3000rpm foi utilizado para dosagem da glicose (método enzimático da glicose-oxidase) (HENRY et al., 1974), ácidos graxos livres (NOGUEIRA et al., 1990) e colesterol (método enzimático colorimétrico, kit Labtest). A insulina e a corticosterona foram dosadas por radioimunoensaio (RIA) (kit Coat-A-Count – DPC).

Imediatamente após o sacrifício foi realizada laparotomia mediana para a retirada de amostras do coração (200mg), fígado (500mg) e músculo gastrocnêmio (200mg) para a análise do glicogênio de acordo com técnica proposta por Sjörgreen et al. (1938) e Dubois et al. (1956).

#### Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente por teste t-Student para amostras independentes com nível de significância pré-estabelecido em 5%.

## Resultados

A realização aguda do esforço promoveu aumento dos níveis de glicose (38,55%), AGL (85,5%) e corticosterona (125,2%) no soro dos animais (Tabela 1). Foi observada significativa queda da insulinemia (54,8%), e manutenção da colesterolemia após a realização do esforço agudo (Tabela 1). Ao término do exercício, os níveis de glicogênio muscular e hepático apresentaram redução de 50,7% e 16,15% respectivamente em relação aos valores de repouso (Tabela 2). O glicogênio cardíaco do grupo EA não diferiu do grupo REP (Tabela 2).

Tabela 1. Glicose (mg/dL), ácidos graxos livres (AGL) (mEq/mL), insulina ( $\mu$ UI/mL), colesterol (mg/%) e corticosterona (ng/mL) séricos de ratos na condição de repouso e após a realização de 4 séries de 10 saltos com carga de 50% da massa corporal. (M = média; DP = desvio padrão).

		Glicose	AGL	Insulina	Colesterol	Corticosterona
<b>Repouso</b>	M	98,3	269,93	15,7	65,88	107,92
	DP	8,0	22,69	2,0	6,43	77,44
<b>Agudo</b>	M	136,2*	500,66*	7,1*	71,41	243,07*
	DP	16,1	106,06	3,8	17,73	133,06

\*  $p < 0,05$ .

Tabela 2. Glicogênio (mg/%) muscular, cardíaco e hepático de ratos na condição de repouso e após a realização de 4 séries de 10 saltos com carga de 50% da massa corporal. (M = média; DP = desvio padrão).

		Muscular	Cardíaco	Hepático
<b>Repouso</b>	M	0,71	0,30	8,79
	DP	0,13	0,06	0,46
<b>Agudo</b>	M	0,35*	0,31	7,37*
	DP	0,06	0,10	1,07

•  $p < 0,05$ .

•



## Discussão

Grande parte dos modelos experimentais de atividades físicas para animais tem sido baseada em exercícios aeróbios, de longa duração e baixa-moderada intensidade, o que gera dúvidas sobre os possíveis efeitos de esforços mais intensos e intermitentes sobre as respostas orgânicas de animais exercitados.

Algumas propostas de protocolos de exercício físico com características anaeróbias e de alta intensidade têm despertado maior interesse nos últimos anos, tendo em vista os benefícios que este tipo de atividade pode resultar (KRISTIANSEN et al., 2000). Além disso, comparado com a quantidade de estudos envolvendo atividades aeróbias, o número de pesquisas acerca do assunto é bastante reduzido.

O modelo de exercício físico utilizado no presente estudo pode ser caracterizado como anaeróbio em função da intensa mobilização de glicogênio muscular e dos elevados níveis de lactato sanguíneo observados por trabalhos anteriores (ROGATTO, 2001; ROGATTO; LUCIANO, 2001a).

O comportamento da glicose durante e após a realização aguda de esforço tem sido bastante variado em função das diferenças nas atividades empregadas. O desempenho de exercício de natação com cargas que variaram de 0 a 8% em relação ao peso corporal por 30 ou 60 minutos, em alguns casos não resultou em modificações no perfil glicêmico na condição aguda (FELÍCIO et al., 1999; PRADA et al., 1997; SANTOS, 1995). Reduções da glicemia também têm sido observadas após a realização aguda de esforço aeróbio como reportado por Nardo e Luciano (1997). Nestes casos o aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos durante o exercício pode ser o fator responsável pela queda glicêmica. Por outro lado, os resultados do atual estudo apontaram para aumentos das concentrações séricas de glicose, o que corrobora com achados anteriores (ROGATTO; LUCIANO, 2001a,b). Esta resposta hiperglicêmica possivelmente está relacionada com o aumento da atividade simpática com conseqüente aumento da atividade glicogenolítica muscular e hepática. Mecanismos envolvidos com a neoglicogênese também podem estar contribuindo com o incremento da disponibilidade glicêmica em função de elevações na secreção de hormônios glicocorticóides (ROGATTO, 2001). Além disso, vários estudos têm reportado aumentos da resposta secretória de outros hormônios contrarregulatórios como hormônio do crescimento, catecolaminas entre outros após exercício agudo (GOTSHALK et al., 1997; HÄKKINEN; PAKARINEN, 1995; JÜRIMAE, 1990; KRAEMER et al., 1998; ORTEGA et al., 1996; TABATA et al., 1990; VIRU et al., 1998; ZOUHAL et al., 1998).

A baixa concentração sérica de insulina observada em nosso estudo está de acordo com trabalhos anteriores que utilizaram exercícios contínuos e intermitentes (KRAEMER et al., 1998; PERES et al., 1998; ROGATTO; LUCIANO, 2001a,b). A estimulação simpática decorrente da realização aguda de esforço pode ter resultado na inibição da liberação insulínica, o que somado ao aumento da secreção dos hormônios contrarregulatórios contribuiu com a elevação da glicemia.

O metabolismo lipídico também pode sofrer interferência da atividade física, já que a mobilização deste tipo de substrato pode encontrar-se aumentada. Em nosso estudo as concentrações de AGL apresentaram significativo aumento após a realização da sessão única de esforço. Este resultado pode indicar aumento da mobilização dos triglicérides estocados nos adipócitos, o que coincide com trabalho de Stevanato (1999) e também pode estar relacionado com elevações das secreções dos hormônios contrarregulatórios. A manutenção dos níveis de colesterol, detectada pelo atual experimento, mesmo após o exercício agudo, reforça dados encontrados na literatura (JÜRIMAE et al., 1990).

A manutenção do metabolismo intermediário tem importante papel na homeostase orgânica, contribuindo com o fornecimento de energia em condições normais ou em situações onde a exigência metabólica encontra-se aumentada. A atividade física aguda é um tipo de estímulo que exige do organismo maior mobilização de substrato energético, inclusive das reservas de carboidratos (BILLETER; HOPPELER, 1992). Em nosso estudo observamos que os estoques de glicogênio hepático e muscular apresentaram significativa redução após a realização do exercício agudo. Este tipo de comportamento metabólico tem sido freqüentemente observado em vários estudos que utilizaram diferentes formas de atividades físicas (AZEVEDO, 1994; ROGATTO, 2001; ROGATTO; LUCIANO, 2001a,b; STEVANATO, 1999). Este decréscimo das reservas de glicogênio está relacionado com a elevação da atividade glicogenolítica causada pelo aumento agudo dos hormônios catabólicos (KJAER, 1998).

A manutenção nos teores de glicogênio cardíaco pós-exercício, observada no presente estudo, pode dever-se a economia de substrato glicídico em função da utilização de ácidos graxos por meio do ciclo de Randle (LUCIANO; LIMA, 1997; ROGATTO; LUCIANO, 2003). Estudos prévios que investigaram a influência do exercício físico intenso e intermitente sobre as reservas de glicogênio cardíaco em animais diabéticos observaram relação entre os metabolismos de carboidratos e gorduras, indicando a participação do ciclo glicose-ácidos graxos sobre o acúmulo de substrato glicídico no miocárdio (ROGATTO, GOMES;

LUCIANO, 2004). Esta hipótese pode ser considerada para explicar a manutenção dos teores de glicogênio cardíaco, uma vez que foi observada elevação das concentrações de AGL na condição de exercício agudo, o que pode ter aumentado o fornecimento de substrato lipídico para oxidação neste tecido.

### Conclusões

A partir da análise dos resultados podemos concluir que a realização aguda de exercício físico intenso e intermitente parece ter maior influência sobre os metabolismos de carboidratos e gorduras, tendo em vista a mobilização dos estoques de glicogênio muscular e hepático e o aumento das concentrações de glicose e AGL.

### Referências

- AZEVEDO, J. R. M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados, durante e após exercício agudo de natação.** 1994. 139f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- BILLETER, R.; HOPPELER, H. Muscular basis of strength. In: KOMI, P. (Ed.). **Strength and power in sport: the encyclopaedia of sports medicine.** Oxford: Blackwell, 1992. p.39-63.
- COYLE, E. F.; JEUKENDRUP, A. E.; WAGENMAKERS, A. J. M.; SARIS, W. H. M. Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.273, n.2, p.E268-E275, 1997.
- DUBOIS, B.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- FELÍCIO, P. F. V.; DRIGO, A. J.; AZEVEDO, J. R. M. Efeito da administração de ascorbato (vitamina C) associada ao exercício agudo de natação sobre os níveis de substratos energéticos em cobaias. **Motriz**, Rio Claro, v.5, n.1, p.92, 1999.
- FLECK, S. J.; KRAEMER, W. J. **Fundamentos do treinamento de força.** 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.
- GOTSHALK, L. A.; LOEBEL, C. C.; NINDL, B. C.; PUTUKIAN, M.; SEBASTINELLI, W. J.; NEWTON, R. U.; HÄKKINEN, K.; KRAEMER, W. J. Hormonal responses of multiset versus single-set heavy-resistance exercise protocols. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Champaign, v.22, n.3, p.244-255, 1997.
- HÄKKINEN, K.; PAKARINEN, A. Acute hormonal response to heavy resistance loading in men and women at different ages. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.16, n.8, p.507-513, 1995.
- HARGREAVES, M. Interactions between muscle glycogen and blood glucose during exercise. **Exercise and Sport Science Reviews**, San Diego, v.25, p.21-39, 1997.
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WILKEMAN, J. **Clinical chemistry, principles and techniques.** 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.
- JÜRIMAE, T.; KARELSON, K.; SMIRNOVA, T.; VIRU, A. The effect of a single-circuit weight-training session on the blood biochemistry of untrained university students. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.61, n.5-6, p.344-348, 1990.
- KJAER, M. Adrenal medulla and exercise training. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v. 77, n.3, p.195-199, 1998.
- KRAEMER, W. J.; HÄKKINEN, K.; NEWTON, R. U.; McCORMICK, M.; NINDL, B. C.; VOLEK, J. S.; GOTSHALK, L. A.; FLECK, S. J.; CAMPBELL, W. W.; GORDON, S. E.; FARREL, P. A.; EVANS, W. J. Acute hormonal responses to heavy resistance exercise in younger and older men. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.77, n.3, p.206-211, 1998.
- KRISTIANSEN, S.; GADE, J.; WOJTASZEWSKI, J. F.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Glucose uptake is increased in trained vs. untrained muscle during heavy exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 89, n.3, p.1151-1158, 2000.
- LUCIANO, E.; LIMA, F. B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, Uberlândia, v.18, p.47-60, 1997.
- NARDO, N.; LUCIANO, E. Influências do treinamento físico sobre o estresse crônico em ratos diabéticos experimentais. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, 6., 1997, Rio Claro. **Anais...** Rio Claro: DEF/UNESP, 1997. p.55.
- NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. **Métodos de Bioquímica Clínica: técnico-interpretação.** São Paulo: Pancasat, 1990.
- ORTEGA, E.; RODRÍGUEZ, M. J.; BARRIGA, C.; FORNER, M. A. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.17, n.2, p.149-155, 1996.
- PERES, S. B.; CARNEIRO, E. M.; LUCIANO, E.; BOSCHERO, A. C. Physical training and glucose-induced insulin release in isolated pancreatic rat islets. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Hagerstown, v.30, n.5, p.S24, 1998.
- PRADA, F. J. A.; CARNEIRO, E. M.; AZEVEDO, J. R. M.; LUCIANO, E. Respostas endócrino-metabólicas em ratos diabéticos: efeito estressor do exercício agudo. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, Londrina, v.2, n.3, p.22-29, 1997.

- ROGATTO, G. P. **Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos Wistar**. 2001. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de carboidratos. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, Londrina, v.6, n.2, p.39-46, 2001a.
- ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Influência do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de proteínas. **Motriz**, Rio Claro, v.7, n.2, p.75-82, 2001b.
- ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Respostas agudas ao exercício físico intenso: participação do ciclo de Randle. **Motriz**, Rio Claro, v.9, n.1, p.S115, 2003.
- ROGATTO, G. P.; GOMES, R. J.; LUCIANO, E. Exercício físico intenso e diabetes experimental: efeitos sobre o metabolismo de carboidratos no miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v.48, n.2, p.S193, 2004.
- SANTOS, L. A. **Determinação de lactato e glicose sanguínea de ratos treinados e sedentários submetidos ao exercício agudo de natação com sobrecarga fixa**. 1995. Monografia (Graduação em Educação Física) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- SJÖRGREEN, B.; NORDENKJOLD, T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTROM, J. Bertrag zur kuntnis des leberhythmik. **Pflüegers Archiv fuer die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, Berlin, v.240, p.247, 1938.
- STEVANATO, E. **Efeitos do jejum sobre a interação entre o metabolismo de ácidos graxos livres e glicose em músculos esqueléticos de ratos treinados**. 1999. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.
- TABATA, I.; ATOMI, Y.; MUTOH, Y.; MIYASHITA, M. Effect of physical training on the responses of serum adrenocorticotrophic hormone during prolonged exhausting exercise. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.61, n.3-4, p.188-192, 1990.
- VIRU, A.; LAANEOTS, L.; KARELSON, K.; SMIRNOVA, T.; VIRU, M. Exercise-induced hormone responses in girls at different stages of sexual maturation. **European Journal of Applied Physiology**, Berlin, v.77, n.5, p.401-408, 1998.
- ZOUHAL, H.; RANNOU, F.; GRATAS-DELAMARCHE, A.; MONNIER, M.; BENTUÉ-FERRER, D.; DELAMARCHE, P. Adrenal medulla responsiveness to the sympathetic nervous activity in sprinters and untrained subjects during a supramaximal exercise. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.19, n.3, p.172-176, 1998.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Sra. Clarice Yoshico Sibuya pelo excelente apoio técnico nas análises bioquímicas. Suporte Financeiro: FAPESP (00/01804-6)

Endereço:

Gustavo Puggina Rogatto  
Rua Padre Ferraz, 427 – Bairro Santa Cruz  
Itapira - SP  
13.970-250  
e-mail: gustavorogatto@yahoo.com.br

*Manuscrito recebido em 11 de fevereiro de 2004.  
Manuscrito aceito em 27 de outubro de 2004.*