

O EFEITO DO ESTRÓGENO NAS RESERVAS GLICOGÊNICAS DE MUSCULOESQUELÉTICOS DESNERVADOS DE RATAS

SEVERI MTM¹, CHINGUI LJ¹, DELFINO GB² E CANCELLIERO KM³

¹ PPG em Fisioterapia, Departamento de Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP, Piracicaba, SP - Brasil

² Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências da Saúde, UNIMEP, Piracicaba, SP - Brasil

³ PPG em Fisioterapia, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP - Brasil

Correspondência para: Maria Theresa Munhoz Severi, Rua Barão de Piracicamirim, 814, apto 52, CEP 13416-150, Piracicaba, SP – Brasil, e-mail: fisioesa@terra.com.br

Recebido: 12/12/2005 - Revisado: 10/05/2006 - Aceito: 28/08/2006

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito muscular do estrógeno em ratas submetidas à desnervação de membro posterior. **Método:** Ratas *Wistar* foram divididas em 5 grupos (n=6): Controle, Desnervado 7 dias, Desnervado 15 dias, Desnervado tratado com estrógeno (200µg/rato, via subcutânea, diariamente) durante 7 dias e Desnervado tratado com estrógeno durante 15 dias. Após os períodos experimentais, foi realizada a avaliação de glicogênio (GLI) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV), além da avaliação do peso do sóleo. A análise estatística foi feita através do teste de normalidade, ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). **Resultados:** A desnervação promoveu redução (p<0,05) no GLI no período de 7 (S: 44%, GB: 32%; GV: 32%) e de 15 dias (S: 62%, GB: 44%; GV: 53%), além da redução do peso do S (7 dias: 29,7%; 15 dias: 36,6%). Porém, o tratamento com estrógeno promoveu elevação (p<0,05) no GLI, nessa condição, tanto durante 7 dias (S: 19%; GB: 60%; GV: 18%) quanto durante 15 dias (S: 52%; GB: 51%; GV: 11%), mas não foi suficiente para minimizar a redução do peso muscular. **Conclusões:** O tratamento com baixa dose de estrógeno minimizou as alterações metabólicas musculares desencadeadas pela desnervação, porém não foi eficaz em interferir na perda de peso do músculo sóleo, sugerindo que o hormônio atua permitindo uma proteção quimiometabólica com similaridades de ação da via insulínica, porém esse efeito é multifatorial, dependendo da dose, da forma, do tempo de tratamento, além do tempo de desnervação.

Palavras-chave: desnervação, estrógeno, musculoquelético, fisioterapia.

ABSTRACT

The estrogen effect on glycogen reserves of denervated skeletal muscles of female rats

Objective: To evaluate the effects of estrogen on muscles in female rats subjected to hindlimb denervation. **Methods:** Female *Wistar* rats were divided into five groups (n=6): control; denervated 7 days; denervated 15 days; denervated treated with estrogen (200µg/rat, subcutaneously, daily) for 7 days; and denervated treated with estrogen for 15 days. After the experimental periods, glycogen (GLY) evaluations were performed on the soleus (S), white gastrocnemius (WG) and red gastrocnemius (RG), and the soleus was weighed. The statistical analysis was performed using the normality test, ANOVA and Tukey test (p<0.05). **Results:** The denervation caused a reduction (p<0.05) in GLY over a 7-day period (S: 44%, WG: 32%; RG: 32%) and 15-day period (S: 62%, WG: 44%; RG: 53%), and also S weight reduction (7 days: 29.7%; 15 days: 36.6%). However, the estrogen treatment caused elevation (p<0.05) of GLY under this condition, both over 7 days (S: 19%; WG: 60%; RG: 18%) and over 15 days (S: 52%; WG: 51%; RG: 11%), but it was not enough to minimize the muscle weight reduction. **Conclusions:** The treatment with low doses of estrogen minimized the metabolic alterations induced by denervation, but it was not effective in interfering in the weight loss of the soleus muscle. This suggests that the hormone acts by enabling chemical-metabolic protection that acts like the insulin route, but the effect is multifactorial and depends on the dose, manner and duration of the treatment, as well as the time since denervation.

Key words: denervation, estrogen, skeletal muscle, physical therapy.

INTRODUÇÃO

A funcionalidade da dinâmica contrátil da musculatura esquelética depende da integridade de diversos fatores, como a geração de potenciais elétricos na interface da junção neuromuscular; as variações nas concentrações iônicas, geradas pela atividade dos canais iônicos; a atividade metabólica e a modulação dos sistemas participantes dos ajustes metabólicos. Dessa forma, o padrão metabólico das fibras musculares ajusta-se, constantemente, de acordo com a flutuação na disponibilidade de substratos metabolizáveis, sendo influenciado pela sensibilidade e população de receptores de insulina, pela atividade de sistema específico ligado à captação de glicose e pela atividade das enzimas-chave do metabolismo de carboidratos, eventos associados que ressaltam a importância do conteúdo glicogênico enquanto reserva energética limitante de performance ou fadiga¹.

Na condição de repouso, as fibras musculares esqueléticas captam pequenas quantidades de glicose, no entanto, frente ao aumento da atividade contrátil ou na presença da insulina, são desencadeados processos facilitadores de uma maior captação da hexose, a qual pode ser prontamente oxidada, gerando energia ou direcionada para formação de glicogênio².

Estudos direcionados à avaliação das alterações desencadeadas nos músculos desnervados chegaram ao consenso de que, após a interrupção completa de inervação motora, há perda da atividade voluntária e reflexa do músculo; perda de força e massa; redução no diâmetro da fibra, seguida de atrofia muscular progressiva³. Tem sido demonstrado que, concomitante à secção da inervação motora, também ocorrem expressivas modificações relacionadas ao metabolismo de carboidratos, sendo merecedora de destaque a resistência à insulina, desencadeada pela redução na atividade das enzimas reguladoras das vias metabólicas ligadas à interface pós-receptor da insulina; redução na população do GLUT4 (transportador de glicose tipo 4); redução na concentração citosólica do RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) do GLUT 4; redução na expressão gênica dos transportadores GLUT 1 (transportador de glicose tipo 1) e GLUT 4; redução na atividade das enzimas participantes da glicólise e da enzima glicogênio sintetase bem como redução na habilidade da insulina em ativá-la⁴. Esses eventos associados participam das alterações metabólicas que predisõem as fibras musculares à hipotrofia⁵.

Recentes estudos têm demonstrado as relações funcionais entre a inervação motora e a homeostasia metabólica das fibras musculares, em que há um consenso de que a redução de reservas de glicogênio, induzida pela desnervação, pode ser minimizada por fármacos como metformina⁶ e clenbuterol⁷, suplementos energéticos como glutamina⁸ e CGT (creatina-glutamina-aurina)⁷, além de estimulação elétrica neuromuscular⁹.

A literatura científica destaca a importância do estrogênio na homeostasia do sistema reprodutor, cardiovascular e sistema nervoso central¹⁰. Por outro lado, estudos pioneiros, realizados a partir da década de 90, também constataram a presença de receptores de estrogênio nas fibras musculares, sugerindo que inúmeros sistemas podem estar ligados à sua ação, como: manutenção da força muscular, fator de proteção tecidual, agente inibidor da geração de radicais livres, visto que a molécula apresenta similaridades com a vitamina E¹⁰.

Os receptores de estrogênio se dividem em dois tipos, sendo denominados de ER α (receptor de estrogênio α) e ER β (receptor de estrogênio β), detectando-se a presença de receptores do tipo ER β no músculo esquelético de humanos, bovinos, camundongos e ratos^{11,12}.

Recente contribuição para o entendimento da ação dos receptores de estrogênio nas fibras musculares foi demonstrada utilizando imunocitoquímica, sendo observada a presença de receptores ER β tanto nas fibras musculares quanto na capilarização dos músculos¹³.

No que tange ao receptor de estrogênio ER β , estudos *in vivo* têm sugerido relações funcionais com o metabolismo dos carboidratos, em que se tem observado efeito insulínico tanto por induzir secreção de insulina quanto por minimizar a resistência à insulina¹⁴.

Os estudos das relações quimiometabólicas neuromusculares têm mostrado que, além da relação neurotransmissor/receptor responsáveis pela contração muscular, existe uma inter-relação entre a inervação e os mecanismos que permitem a homeostasia nutricional das fibras musculares, visto que fibras desnervadas exibem fortes alterações metabólicas, além de apresentarem resistência à insulina e atrofia.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar as reservas de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio desnervados submetidos ao tratamento com cipionato de estradiol durante 7 e 15 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos ratas *Wistar* (180 a 200 gramas) com idade variando de 3 a 4 meses, que foram alimentadas com ração e água *ad libitum*, sendo submetidas a ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro em temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (n= 5): Controle, Desnervado 7 dias, Desnervado 15 dias, Desnervado tratado com estrogênio durante 7 dias e Desnervado tratado com estrogênio durante 15 dias. Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos, protocolo CEEA nº 011/2006.

Para a desnervação, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico na concentração de 50mg/Kg de peso corporal, sendo tricotomizadas na porção posterior das coxas, por onde uma porção de 5mm do nervo ciático foi seccionado e retirado, segundo o modelo proposto por Coderre et al.⁴.

O tratamento consistiu na administração de cipionato de estradiol pela via subcutânea, na concentração de 200µg/rata diariamente¹⁵, no mesmo período do dia, durante 7 dias e 15 dias, conforme grupos descritos acima.

Após os períodos experimentais, os músculos sóleo e gastrocnêmio branco e vermelho foram isolados, retirados e prontamente encaminhados para as avaliações do conteúdo de glicogênio por meio do método do fenol sulfúrico¹⁶, além da avaliação do peso do sóleo.

A análise estatística dos dados foi feita primeiramente pelo teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Como os dados se apresentaram normais, foram utilizados os testes paramétricos ANOVA (análise de variância) e teste de Tukey, sendo que em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Em decorrência da desnervação, houve uma redução significativa no conteúdo muscular de glicogênio, atingindo no músculo sóleo 44% nos primeiros 7 dias e 62% após 15 dias ($p < 0,05$); no músculo gastrocnêmio porção branca, a redução atingiu 32% nos primeiros 7 dias e 44% após 15 dias ($p < 0,05$) e no músculo gastrocnêmio porção vermelha, a redução atingiu 32% nos primeiros 7 dias e 53% após 15 dias (figuras 1, 2 e 3).

Ao avaliarmos o conteúdo glicogênico do músculo desnervado, observamos que, após 7 dias de tratamento diário com estrogênio, o músculo sóleo apresentou elevação de 19%, enquanto o gastrocnêmio porção branca apresentou elevação de 60%, e o gastrocnêmio porção vermelha apresentou elevação de 18% ($p < 0,05$).

Após o tratamento com estrogênio durante 15 dias, as reservas também foram elevadas, atingindo 52% no sóleo, enquanto o gastrocnêmio porção branca apresentou elevação de 51%, e o gastrocnêmio porção vermelha apresentou elevação de 11% ($p < 0,05$).

Com relação ao peso muscular do sóleo, a desnervação após 7 dias promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) de 29,7% em relação ao controle e, após 15 dias, essa redução foi maior, representada por 36,6% (tabela 1).

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

DISCUSSÃO

A funcionalidade da musculatura esquelética tem fortes relações multifatoriais, representadas pela sensibilidade à insulina, à atividade metabólica tecidual e à atividade contrátil. O suprimento energético de glicose pode ser viabilizado tanto pela ação da insulina quanto pela elevação na atividade contrátil,

em que o mecanismo se localiza na translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) de reservatórios túbulo-vesiculares citosólicos para a membrana, favorecendo, assim, a elevação na captação de glicose para a geração de energia e/ou formação de glicogênio. Nesse sentido, tem-se verificado que 70 a 85% da glicose captada pelo músculo em repouso provavelmente fica reservada na forma de glicogênio¹⁷.

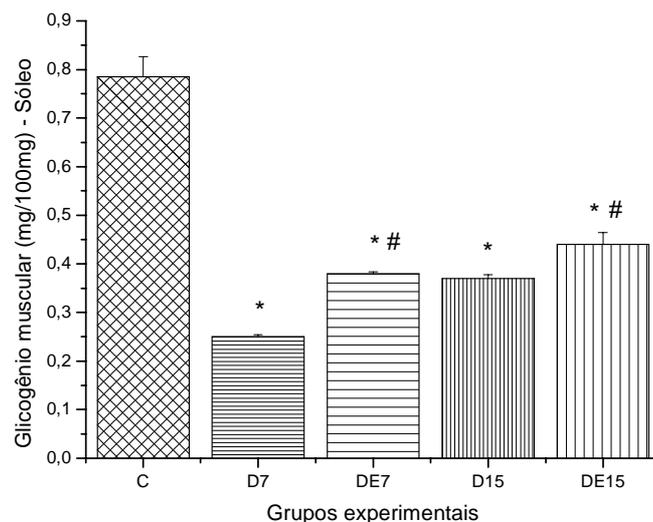


Figura 1. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estrogênio 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estrogênio 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média \pm epm, $n = 5$. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.

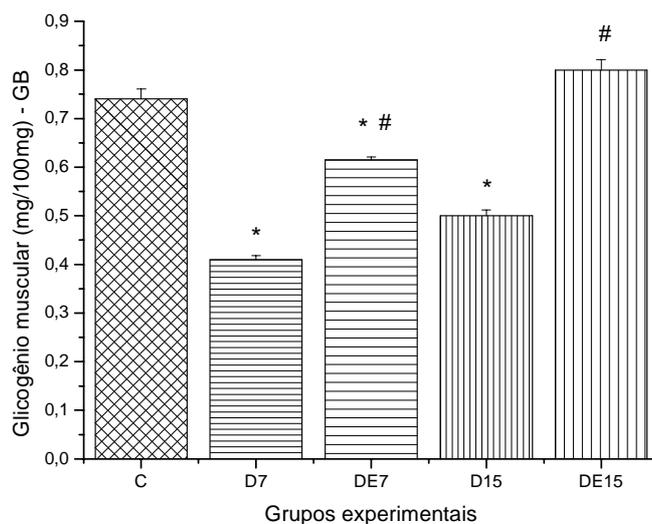


Figura 2. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção branca (GB) dos grupos Controle (C), Desnervado 7 dias (D7), Desnervado 15 dias (D15), Desnervado tratado com estrogênio 7 dias (DE7) e Desnervado tratado com estrogênio 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média \pm epm, $n = 5$. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.

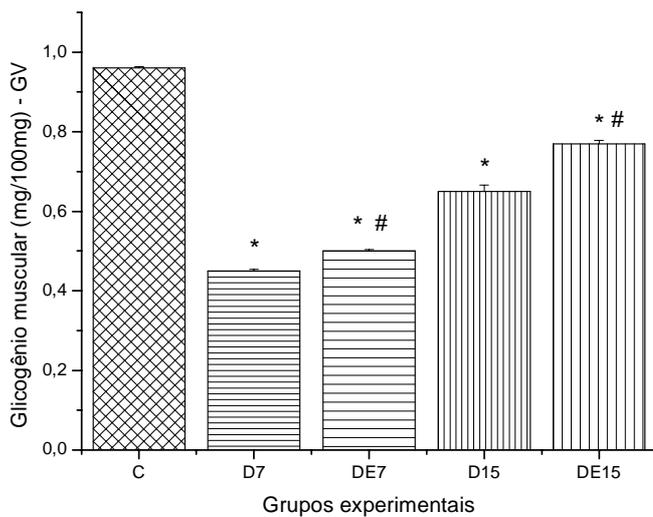


Figura 3. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção vermelha (GV) dos grupos Controle (C), Denervado 7 dias (D7), Denervado 15 dias (D15), Denervado tratado com estrógeno 7 dias (DE7) e Denervado tratado com estrógeno 15 dias (DE15). Os valores correspondem à média \pm epm, n= 5. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.

Tabela 1. Peso muscular (mg) do sóleo dos grupos Controle, Denervado 7 dias, Denervado 15 dias, Denervado tratado com estrógeno 7 dias e Denervado tratado com estrógeno 15 dias. Os valores correspondem à média \pm epm, n= 5. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # comparado ao respectivo desnervado.

Grupos	Peso muscular (mg)
Controle	101 \pm 1,7
Denervado 7 dias	71 \pm 2,9*
Denervado tratado com estrógeno durante 7 dias	84 \pm 8,9*
Denervado 15 dias	64 \pm 1,4*
Denervado tratado com estrógeno durante 15 dias	63 \pm 2,4*

O crescente interesse pelas alterações morfofisiológicas deflagradas pela desnervação da musculatura esquelética tem instigado uma investigação mais minuciosa das relações neuromusculares. Tais estudos têm revelado que concomitante à secção da inervação motora ocorrem expressivas modificações funcionais e metabólicas, predispondo as fibras musculares à atrofia⁶.

Inicialmente, avaliamos o efeito da desnervação sobre a concentração de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio porção branca e vermelha e demonstramos que as reservas foram drasticamente reduzidas, em virtude da desnervação, durante 7 e 15 dias. Esse dado corrobora a proposta de outros autores que têm postulado que, concomitante à secção da inervação motora, ocorre redução

na atividade da cascata de eventos relacionados à ação insulínica, comprometendo a captação e o metabolismo da glicose bem como a sensibilidade à insulina, deflagrando, a partir daí, o quadro de resistência, seguindo a atrofia⁴.

Cabe considerar que, concomitante à desnervação, foi observada uma expressiva perda da massa no músculo sóleo, sugerindo que há uma íntima relação neurotrófica que participa da modulação contrátil-metabólica. Sendo assim, considera-se que os eventos desencadeados pela desnervação correspondem a alterações na tríade de âmbito trófico/metabólico/funcional.

Essas relações quimiometabólicas da musculatura esquelética se expressam tanto de maneira moduladora quanto ativadora, dependendo do *status* funcional do tecido muscular. Um agente que vem desencadeando um crescente interesse na literatura é o estrógeno, cuja população de receptores já foi descrita tanto em fibras musculares quanto nos tecidos circunvizinhos, como no endotélio vascular¹³.

Os resultados deste estudo são pioneiros em demonstrar que as alterações metabólicas desencadeadas pela desnervação foram minimizadas pelo tratamento com estrógeno durante 7 dias, uma vez que as reservas de glicogênio foram elevadas em relação ao desnervado. Porém, o tratamento realizado durante 15 dias só foi suficiente para elevar as reservas do gastrocnêmio branco, ressaltando que o conteúdo do grupo desnervado 15 dias já estava elevado em relação ao desnervado 7 dias, demonstrando que há uma ação moduladora limitada pelo efeito de ação em massa.

Esse fato pode estar relacionado diretamente à baixa concentração de estradiol utilizada neste estudo, à capacidade de atuar no estado insulino-resistente, como observado na desnervação, ou ainda, por um efeito indireto enquanto agente insulínico^{14,18}. Brussaard et al.¹⁹ sugeriram que a ação estrogênica eleva a secreção de insulina e reduz o estado de resistência à mesma.

Kadi et al.²⁰ observaram que a redução na produção do estrógeno está relacionada com os efeitos deletérios no sistema muscular, sendo expressiva a redução na produção de força muscular com relações diretas à funcionalidade das pontes cruzadas.

A ação insulínica do estrógeno vem sendo minuciosamente avaliada, e tem sido demonstrado, em ratas, que esse hormônio atua nas células beta pancreáticas como bloqueador dos canais de potássio modulados pela relação ATP/ADP, deflagrando *per se* o processo secretório e, ao mesmo tempo, potencializando a dinâmica secretória induzida pela glicose^{21,22}. Nesse sentido, tem sido verificado que há uma convergência funcional na rede sinalizadora que integra a ação estrogênica e a insulínica com relações diretas da cascata metabólica, envolvendo o AMPc, MAP kinase e o sistema PI3-K/Akt. Esses mecanismos permitem ao estrógeno atuar rapidamente através de fosforilação e ativação de sistemas protéicos pré-existentes, integrando a ação sinalizadora com a codificação genômica²³.

É importante salientar que o estrogênio, como um agente insulínico, também pode desencadear, a longo prazo, uma resposta secundária e adaptativa, representada por um possível estado de resistência insulínica desencadeada pela exposição constante à insulina induzida pela terapia²⁴. No entanto, recentemente foi demonstrado que a sensibilidade insulínica tecidual passa por um ajuste funcional, em que, na presença do estrogênio, há elevação na sensibilidade insulínica, reiterando nossos resultados¹⁸.

Apesar de existirem evidências de que o tratamento com estrogênio promove uma ação inibidora da ação insulínica, tem sido demonstrada a dinâmica funcional do estrogênio e suas relações com a ação da insulina, existindo relações diretas com a homeostasia glicêmica e a manutenção de condições metabólicas adequadas, tendo em vista que baixas doses do hormônio são efetivas em promover um aumento no número dos receptores de insulina, principalmente no tecido muscular, sendo observado um efeito máximo a partir do sexto dia²⁴.

Nossos resultados corroboram esse estudo, uma vez que a dose administrada foi baixa e os períodos analisados foram 7 e 15 dias, mostrando a ação estrogênica em elevar as reservas de glicogênio no período de 7 dias em todos os músculos analisados e, somente nas fibras brancas, representada pelo gastrocnêmio branco, no período de 15 dias. Gonzalez et al.²⁴ observaram que o efeito do estradiol em elevar a sensibilidade à insulina manifesta-se no fígado e no músculo do 6º ao 11º dia de tratamento, porém após o 16º dia, sua ação manifestou-se apenas no tecido muscular.

CONCLUSÃO

O tratamento com baixa dose de estrogênio minimizou as alterações metabólicas musculares desencadeadas pela desnervação, porém não foi eficaz em interferir na perda de peso do músculo sóleo, sugerindo que o hormônio atua no sentido de permitir uma proteção quimiometabólica com similaridades de ação da via insulínica, porém esse efeito é multifatorial, dependendo da dose, da forma, do tempo de tratamento, além do tempo de desnervação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taylor R. Insulin action. *Clinical Endocrinology*. 1991;34:159-71.
2. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle and Nerve*. 2004;30(1):77-86.
3. Sowell MO, Boggs KP, Robinson KA, Dutton SL, Buse MG. Effects of insulin and phospholipase C in control and denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1991;260(2):247-56.
4. Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol*. 1992;131(4):1821-5.
5. Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter*. 2004;8(1):21-7.
6. Cancelliero KM, Barros FG, Menezes RCLC, Silva CA. Efeito do CGT e do Clombuterol no perfil metabólico do músculo esquelético desnervado. *Revista de Ciências Médicas*. 2004;13(4):327-35.
7. Forti F, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*. 2004;18(3):273-81.
8. Cancelliero KM, Forti F, Silva CA, Guirro RRJ. Calcitonina inibe os efeitos benéficos da estimulação elétrica no músculo esquelético. *Revista Fisioterapia em Movimento*. 2005;18(2):25-33.
9. Joels M. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Front Neuroendocrinol*. 1997;18:2-48.
10. Wiik A, Glenmark B, Ekman M, Esbjornsson-Liljedahl M, Johansson O, Bodin K, et al. Estrogen receptor β is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:381-7.
11. Lemoine S, Granier P, Tiffocche C. Effect of endurance training on estrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2003;174:283-9.
12. Lemoine S, Granier P, Tiffocche C, Rannou-Bekono F, Thieulant ML, Delamarche P. Estrogen receptor alpha mRNA in human skeletal muscle. *Med Sci Sport Exerc*. 2004;35:439-43.
13. Wiik A, Ekman M, Esbjornsson-Liljedahl M, Johansson O, Jansson E. Estrogen receptor β is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol*. 2005;124:161-5.
14. Nadal A, Rovira JM, Labiri O, Leon-Quinto T, Andreu E, Ripoll C, et al. Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J*. 1998;12:1341-8.
15. Feng X, Zhen-Guo LI, Wang S. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle strain injury and regeneration in female rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(11):1489-94.
16. Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28(2):234-6.
17. Kelley DE, Reilly JP, Veneman T. Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am J Physiol*. 1990;258:923-9.
18. Song D, Arikawa E, Galipeau DM, Yeh JN, Battell ML, Yuen VG, et al. Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. *Am J Hypertens*. 2005;18(9):1189-94.
19. Brussaard HE, Gevers-Leuven JA, Frolich M, Kluft C, Krans HMJ. Short-term estrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in post-menopausal women with NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40:843-9.

20. Kadi F, Karlsson C, Larsson B, Eriksson J, Larval M, Billig H, et al. The effect of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscle following ovariectomy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23:335-9.
21. Nadal A, Ropero AB, Fuentes EB, Ripoll C. Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids.* 2004;69(8-9):531-6.
22. Godsland IF. Estrogen and insulin secretion. *Diabetologia.* 2005;48(11):2213-20.
23. Wu CH, Liu JY, Hsieh YH, Hwang JM, Lee SD, Chen LM, et al. 17 β -Estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. *Life Sci.* 2005;78(4):347-56.
24. Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Diaz F, Esteban MM, Fernandez S, et al. Role of 17 beta-estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor. *Steroids.* 2002;67(13-14):993-1005.