

Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG

**JÚNIA RIBEIRO DE OLIVEIRA LONGO SCHWEIZER**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA  
GLICOSE PLASMÁTICA E NA SECREÇÃO DE INSULINA DE  
RATOS CRONICAMENTE TRATADOS COM ENALAPRIL E  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO**

Belo Horizonte

2011

Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG

**JÚNIA RIBEIRO DE OLIVEIRA LONGO SCHWEIZER**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA  
GLICOSE PLASMÁTICA E NA SECREÇÃO DE INSULINA DE  
RATOS CRONICAMENTE TRATADOS COM ENALAPRIL E  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais para  
a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Jr.

Belo Horizonte

2011

**Reitor:** Professor Clélio Campolina

**Pró-reitores de pós-graduação:** Professor Ricardo Santiago Gomez e Professora Andréia Gazzinelli Corrêa de Oliveira

**Diretor do Instituto de Ciências Biológicas:** Professor Tomaz Aroldo de Mota Santos

**Coordenadora do curso de pós-graduação em Neurociências:** Professora Ângela Maria Ribeiro

**Local de realização:** Laboratório de Endocrinologia – UFMG

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Jr.

**Agências financiadoras:** CAPES, FAPEMIG

**Agradecimentos:**

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao Toninho, em especial, pela competência, exemplo, oportunidades e amizade, durante toda essa trajetória.

À Wal, pelos conselhos oportunos e pelo estímulo à vida acadêmica.

Aos colegas, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho e por terem tornado o Laboratório de Endocrinologia tão agradável.

A todos os amigos, pela torcida.

Agradeço também à minha família. Em especial, ao Tomas, companheiro sem igual, que sempre me estimulou a realizar meus sonhos. E também aos meus pais e ao Felipe, por serem tão amigos. Vocês tornaram esse período inesquecível!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VI
RESUMO .....	VII
RESUMO EM INGLÊS (ABSTRACT) .....	VIII
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	13
MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
Considerações éticas .....	14
Delineamento experimental.....	14
Animais .....	14
Tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina (enalapril) versus veículo.....	14
Coleta de sangue.....	15
Grupos experimentais.....	15
Estresse de contenção.....	16
Métodos de Análise Química .....	16
Determinação da glicose e insulina plasmáticas .....	16
Análise estatística.....	17
RESULTADOS.....	18
Efeitos do estresse de contenção na glicose plasmática.....	18
Efeitos do estresse de contenção na insulina plasmática.....	20
DISCUSSÃO.....	23
ANEXO I .....	39
APÊNDICE I.....	40
Apêndice IA .....	40
Apêndice IB .....	40
APÊNDICE II .....	41

APÊNDICE III ..... 60

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 .....	4
Figura 2 .....	8
Figura 3 .....	10
Figura 4 .....	16
Figura 5A .....	19
Figura 5B.....	20
Figura 6A .....	21
Figura 6B.....	22
Figura 7 .....	27
Figura 8 .....	29

## RESUMO

Evidências têm sido acumuladas sobre a participação e importância do sistema renina-angiotensina (SRA) no metabolismo de carboidratos e em sua modulação da resposta ao estresse. O objetivo desse estudo é avaliar os efeitos do bloqueio crônico do SRA com enalapril sobre os níveis de glicose e insulina plasmáticos no estresse de contenção. Foram utilizados ratos machos Holtzman, tratados com solução de enalapril 10 mg/kg de peso por dia ou veículo por 14 dias. Uma conexão de polietileno foi adaptada a um cateter atrial. Após uma hora de adaptação, amostra sanguínea basal foi coletada e os ratos foram submetidos ao estresse de contenção. Amostras foram colhidas aos 5, 10, 20 e 30 minutos (min.). Os grupos experimentais foram divididos em: enalapril + contenção (EC); veículo + contenção (VC) e enalapril + salina (ES). Após o estresse, houve resposta hiperglicêmica aos 5 min., em EC, e aos 10 min., em VC, com pico em 20 e 10 min., respectivamente ( $P > 0,05$ ). Em ES, os níveis glicêmicos não variaram significativamente ( $P > 0,05$ ). Não houve diferença estatística quando comparadas as áreas sob a curva de glicose plasmática dos grupos EC, VC e ES ( $P > 0,05$ ). O estresse de contenção induziu um importante aumento na secreção de insulina em EC, em contraste com um leve incremento em VC. Ambos os grupos EC e VC tiveram um pico na secreção de insulina aos 20 minutos ( $P < 0,05$ ). Em ES, a secreção de insulina não variou significativamente ( $P > 0,05$ ). Esses dados reforçam a modulação da resposta ao estresse pela inibição do SRA e mostra, pela primeira vez que, a inibição crônica do SRA pelo enalapril aumenta a secreção de insulina glicose mediada, em um modelo de estresse com leve hiperglicemia como no estresse agudo de contenção.



**ABSTRACT**

There is increasing evidence of renin-angiotensin system (RAS) involvement in carbohydrate metabolism and its response modulation to stress. Restraint is a straightforward stress model that, although painless, powerfully activates the limbic system, besides activating hypothalamic stress regulator nucleus. This study aimed to evaluate the effects of chronic inhibition of RAS with enalapril upon glucose and insulin levels during acute restraint stress. Male Holtzman rats were treated with enalapril solution 10 mg/kg body weight per day or vehicle for 14 days. A silastic connection was adapted to an atrium catheter. After 1h adaptation, the basal sample was collected and the rats were then submitted to restraint stress. Samples were drawn at 5, 10, 20 and 30min. The experimental groups were divided into: enalapril + restraint (ER), vehicle + restraint (VR) and enalapril + saline (ES). After restraint, there was a hyperglycemic response already at 5min in ER and at 10min VR, with peak at 20 and 10min, respectively ( $P < 0.05$ ). In ES, glucose levels did not vary significantly during the experiment ( $P > 0.05$ ). No significant differences were observed when comparing ER, VR and ES areas under glucose curves ( $P > 0.05$ ). Restraint induced an important increase in insulin secretion in ER, contrasting with a mild elevation in VR, both with a peak at 20min ( $P < 0.05$ ). In ES, insulin secretion did not vary significantly ( $P > 0.05$ ). Our data reinforce the response modulation of RAS inhibition to stress and shows, for the first time, that RAS inhibition with enalapril augments the glucose-induced insulin secretion, even in a mild hyperglycemic stress such as in acute restraint.

## INTRODUÇÃO

O primeiro autor a introduzir o termo “homeostase” foi Cannon, a fim de descrever os processos coordenados que mantêm o equilíbrio constante em nosso organismo. (1) Embora esse autor tenha enfatizado o sistema nervoso simpático e incluído resposta psicológica dentre os mecanismos para se manter a homeostase, o termo “estresse” apenas foi introduzido na literatura médica por Selye. (2) Esse último considerava a resposta ao estresse como geral e inespecífica, com ênfase no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, definindo o estresse como uma “subtração de componentes específicos da resposta total”. Assim, o organismo responderia a qualquer tipo de estresse desencadeado com a “síndrome do estresse”, composta por uma tríade fixa: aumento adrenal, ulceração gástrica e involução tímica e linfática. Com a evolução das teorias em estresse, autores como Chrousos e Gold, passaram a considerar a especificidade da resposta a cada tipo de estresse, enquanto outros, como Sapolsky e colaboradores incluíram a participação do sistema nervoso central na resposta ao estresse. (1;3)

O interesse por essa área ainda persiste atualmente, dada à necessidade de compreender melhor as respostas compensatórias desencadeadas pelo estresse, bem como seus mecanismos e implicações. Aventa-se que, uma vez ocorrido o estresse, esse possa levar a respostas compensatórias exageradas, por vezes ocasionando prejuízos ao organismo, embora os mecanismos não estejam completamente elucidados. Com o progresso da neuroendocrinologia, nas últimas décadas, constatou-se que diferentes respostas comportamentais levam a diferentes padrões de ativação neuroendócrina no estresse.

A manutenção de níveis glicêmicos adequados é importante para as funções fisiológicas, principalmente para o funcionamento do sistema nervoso central, já que esse não consegue estocar ou sintetizar glicose, sua principal fonte de energia. Assim, para a adequada função cerebral, mais de noventa por cento da energia utilizada é proveniente da oxidação da glicose. (4;5) A homeostase glicêmica é mantida por um complexo mecanismo neuroendócrino, envolvendo além do sistema nervoso central, e em particular o hipotálamo, o sistema simpático, fígado, pâncreas e adrenal. (5) Em condições fisiológicas, o controle glicêmico ocorre principalmente pela insulina, enquanto a glicemia também exerce efeito

sobre a regulação desse hormônio. Em situações em que há um aumento gradual da glicemia, a secreção de insulina eleva-se também lentamente. Já em situações em que ocorre uma elevação abrupta da glicemia, ocorre uma secreção bifásica de insulina. A primeira fase corresponde a um pico precoce e rápido, seguido de um nadir e uma elevação mais lenta da secreção de insulina (a segunda fase). (4) A glicose é o principal estímulo para a primeira fase de secreção de insulina. Essa última atua na inibição da produção hepática de glicose, reduzindo a glicogenólise e gliconeogênese, além de estimular a utilização periférica de glicose, resultando em redução da glicemia. As ilhotas pancreáticas recebem inervação autonômica, sendo a secreção hormonal pancreática dependente tanto da ativação do sistema nervoso simpático, quanto do parassimpático. Quando ocorre estimulação dos nervos simpáticos para o pâncreas, há aumento da liberação de glucagon e redução da secreção de insulina e de somatostatina. (6) Já o estímulo vagal pancreático resulta em liberação de insulina, enquanto que, o estímulo esplâncnico, causa liberação de glucagon e supressão da secreção de insulina. A norepinefrina, neurotransmissor do sistema simpático, influencia a liberação de insulina através da estimulação dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  da célula beta pancreática. Enquanto a estimulação do receptor  $\alpha$  leva à inibição da secreção de insulina, o estímulo do receptor  $\beta$ , ao contrário, leva a aumento na liberação desse hormônio. A acetilcolina, neurotransmissor do sistema parassimpático, tem efeito estimulatório na secreção de insulina. (7) Há evidências de que os sistemas nervosos simpático e parassimpático não sejam independentes, ou seja, ocorre uma interação entre eles. (8;9)

A resposta neuroendócrina ao estresse ativa principalmente o sistema simpático adrenomedular, quando os animais são submetidos à situação desafiadora que simula a “fuga ou luta”. Por outro lado, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é predominantemente ativado quando submetemos os animais à situação de estresse, em que há perda do controle e mais passividade em relação à situação estressora. (10) No estresse de contenção, utilizado nesse trabalho, há estímulo importante de ambas as vias. Assim, há estímulo do sistema simpático, e aumento nas catecolaminas plasmáticas pode ser verificado após apenas um minuto do início desse estresse. Entretanto, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também é ativado, principalmente pelo fato do animal ter restrição dos movimentos, e isso

possivelmente desencadear ansiedade, principalmente quando o animal detecta a impossibilidade de escapar do imobilizador.

No estresse, também pode ocorrer modulação da função pancreática. Sabe-se que frente à situação de estresse, ocorre aumento da glicemia, da secreção de glucagon, do cortisol, de hormônio do crescimento, de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) e inibição da secreção de insulina. (11) Há ativação do sistema nervoso simpático e aumento da secreção de catecolaminas, com incremento da epinefrina, devido à produção adrenal, e de norepinefrina pelos gânglios simpáticos. Um dos mecanismos de aumento da glicose plasmática seria mediado pela epinefrina, devido à estimulação da liberação hepática de glicose, tanto pela glicogenólise, quanto pela gliconeogênese. Além disso, a redução de insulina, mediada pelo aumento da norepinefrina e epinefrina, teria um efeito permissivo na hiperglicemia. Particularmente no estresse de contenção, ocorre um incremento plasmático importante do ACTH, norepinefrina e principalmente de epinefrina, com consequente aumento de glucagon. Assim, ocorrerá hiperglicemia e redução da secreção de insulina.(12) (Figura 1)

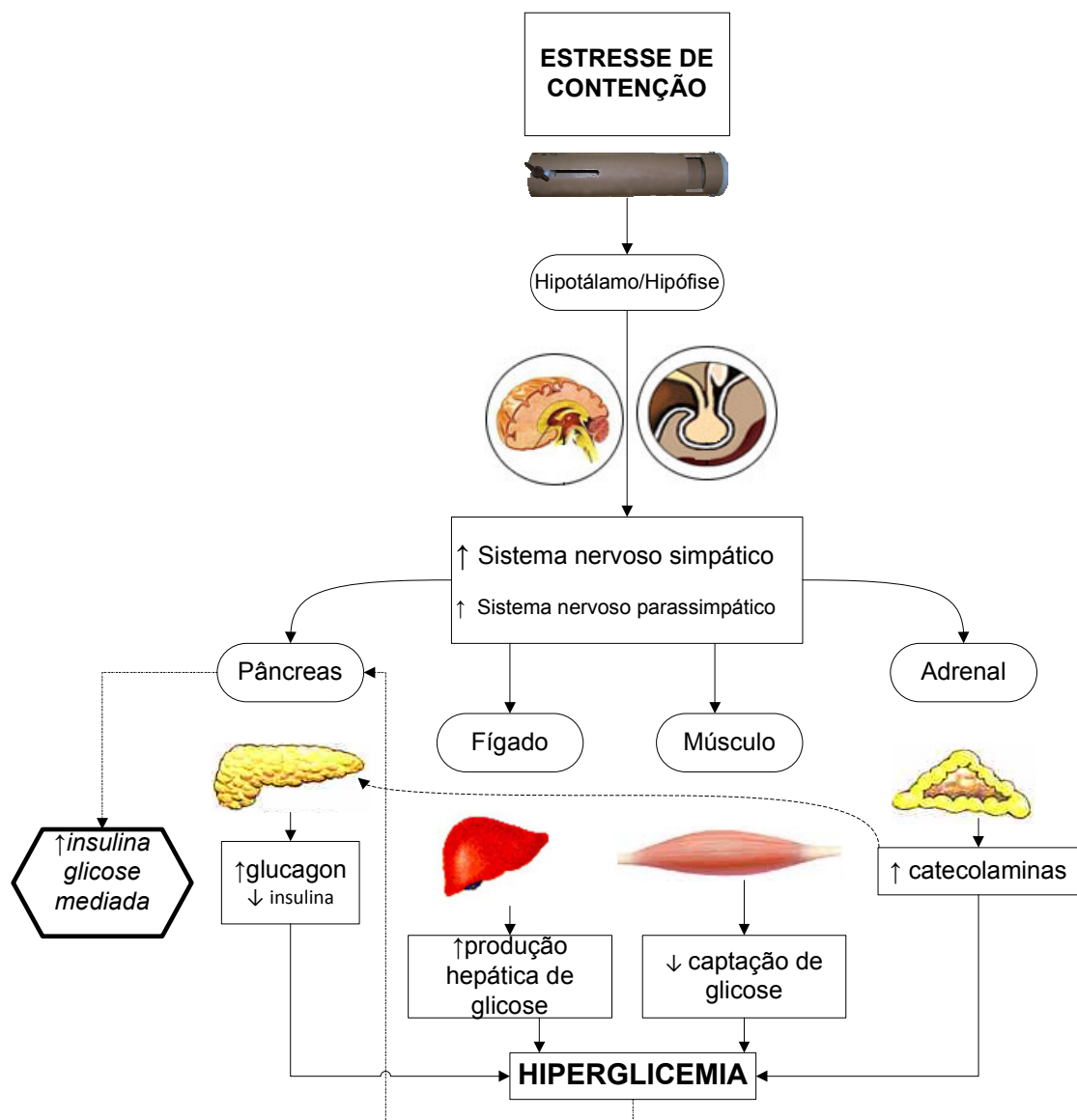


Figura 1: Mecanismos envolvidos na regulação glicêmica no estresse de contenção.

O adequado controle da secreção de insulina é essencial ao organismo a fim de evitar situações danosas. Assim, modificações na célula beta pancreática podem alterar a homeostase glicêmica, podendo levar à hipoglicemia e seus riscos, se secreção excessiva de insulina ocorrer. Por outro lado, poderão ocorrer hiperglicemia e seus danos, em caso de secreção insuficiente de insulina. Dessa maneira, frente à resposta hiperglicêmica ao estresse, a insulina, que inicialmente encontra-se reduzida, devido à resposta endócrino-metabólica ao estresse, terá elevação, em caso de hiperglicemia persistente, uma vez que a secreção de insulina é principalmente estimulada por glicose. (Figura 1)

Os mecanismos que estimulam e modificam a secreção de insulina têm sido motivos de estudos, mas acredita-se que a glicose seja o fator mais importante. O aumento de glicose plasmática leva ao aumento do metabolismo da célula beta. Ocorre aumento de adenosina-trifosfato (ATP), que leva ao fechamento do canal de potássio ATP dependente. A redução do efluxo de potássio, por sua vez, leva à despolarização da membrana, seguida pela abertura dos canais de cálcio e aumento intracelular desse íon, na célula beta pancreática, o que leva à exocitose dos grânulos de insulina (13). Dessa maneira, a amplitude da secreção de insulina está relacionada à magnitude do aumento do cálcio intracitoplasmático, podendo haver outros mecanismos envolvidos na regulação do influxo de cálcio intracitoplasmático. (14;15).

Com relação à especificidade da resposta ao estresse, encontram-se diferenças no padrão de resposta dependendo do tipo de estresse e também de sua intensidade e duração (16;17). Diversos modelos de estresse têm sido utilizados a fim de estudar a regulação neuroendócrina, sendo cada modelo de estresse mais adequado para estudar determinadas vias de mediação deste, considerando diferentes ativações possíveis, dependendo do modelo de estresse. Assim, o estresse neurocitoglicopênico, um modelo de estresse metabólico anteriormente estudado por nós, tem ação principal devido à ativação do sistema nervoso autônomo. (18;19) O estresse por frio pode ser utilizado para avaliar os mecanismos homeostáticos de controle de temperatura corporal e de áreas termorreguladoras, como as regiões hipotalâmicas anterior e preóptica. Já o estresse cirúrgico e anestésico, são úteis para avaliar a resposta endócrino metabólica ao trauma (20-22), enquanto o estresse hemorrágico pode ser utilizado para estudar as alterações metabólicas, em resposta às variações hemodinâmicas. (11;23)

O estresse de contenção tem sido atualmente utilizado como um potente modelo de estresse físico e emocional, que causa desconforto, sem dor aparente, além de permitir simular o estresse psicossocial humano, tão frequente na sociedade moderna. O estresse de contenção/ imobilização é um modelo de estresse utilizado de longa data. Selye foi o primeiro pesquisador a utilizá-lo. Nessa época, o procedimento para imobilização do rato consistia em amarrar as patas do rato juntas e envolvê-lo em um pano, a ponto de imobilizá-lo.(24) Desde então, diversas técnicas foram descritas na literatura, tais como: colocar o animal em tubo de vidro ou plástico; amarrar as patas do animal ou fixá-las em

uma superfície; restringir o movimento do animal a um dos cantos da gaiola colocando um painel; envolver o animal completamente com gaze ou toalha, apenas preservando a cauda e o focinho. Embora diversas, não há estudos comparando as técnicas a ponto de definir qual seria a melhor delas. (20;25;26)

Assim como sumarizado por Buynitsky e colaboradores (24), a duração e intensidade do estresse de contenção também podem alterar a resposta ao estímulo estressor. A intensidade do estresse de contenção, que se refere à limitação dos movimentos, pode modular o nível psicológico de estresse. A duração, que se refere ao tempo de estresse a que o animal foi submetido em cada sessão, deve variar dependendo da resposta ao estresse de contenção que se encontra em estudo. Isso porque se aumentarmos a duração do estresse de contenção, não necessariamente teremos aumento da experiência de estresse e nem incremento na resposta ao estresse em estudo. Adaptação à situação estressante pode ocorrer, com ativação de mecanismos compensadores para tentar restabelecer a homeostase. Com relação ao metabolismo de carboidratos, em minutos podemos observar a modulação pelo estresse de contenção, considerando a rapidez da ativação autonômica, o que justifica a utilização do estresse agudo de contenção nesse trabalho. Além disso, recente estudo (27) mostrou que a exposição ao estresse de contenção crônico, em que ratos foram expostos diariamente a esse modelo de estresse, causou adaptação ao estresse e redução da ativação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal, com menor resposta glicêmica. Outro estudo (28) sugere que o estresse crônico possa levar à perda de peso e alteração do metabolismo glicêmico, com modificação da secreção de corticosterona e de insulina, com resistência a esse último hormônio.

No estresse agudo de contenção em ratos, há hiperglicemia mediada principalmente pelo aumento de epinefrina, embora a redução da insulina plasmática e o aumento de corticosterona, de norepinefrina e de glucagon também possam contribuir.(29) O estresse de contenção é simples e efetivo, com evidência de aumento rápido nos níveis plasmáticos de catecolaminas, com pico precoce, com descrição de já ser detectável após um minuto de estresse. (30). Assim, no estresse de contenção com duração de trinta minutos, utilizado em nosso trabalho, já seria possível avaliar os efeitos iniciais da ativação catecolaminérgica desse modelo de estresse.

A participação do sistema nervoso central nas respostas ao estresse tem sido motivo de alguns estudos. A ativação noradrenérgica hipotalâmica pelo estresse é associada ao aumento da glicose plasmática (31). Com relação ao estresse de contenção, sabe-se que há ativação dos núcleos hipotalâmicos, principalmente dos núcleos paraventriculares, com alto grau de ativação e, dos núcleos supra-ópticos, dorso-mediais, supra- mamilares e da área lateral hipotalâmica, com moderado grau de ativação. Além disso, há ativação importante do tálamo, córtex cingulado e piriforme, núcleo pontino, grupos celulares catecolaminérgicos e do núcleo central da amígdala. Esse estresse em ratos acarreta também incremento plasmático de norepinefrina, epinefrina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona. Há evidência de que a ativação neuroendócrina ocorra com estresse agudo de contenção, com ativação máxima dentro dos primeiros trinta minutos de estresse. (32-35)

Dada a complexidade das vias de ativação do estresse e o reconhecimento de que o sistema renina-angiotensina (SRA) possa modulá-lo, estudos buscando elucidar a associação entre estresse e o sistema renina-angiotensina (SRA) têm sido de grande interesse na atualidade. O SRA classicamente descrito consiste na síntese de renina, por células especializadas da arteríola aferente renal, as células justaglomerulares, a partir da pró-renina, seu precursor. (Figura 2).



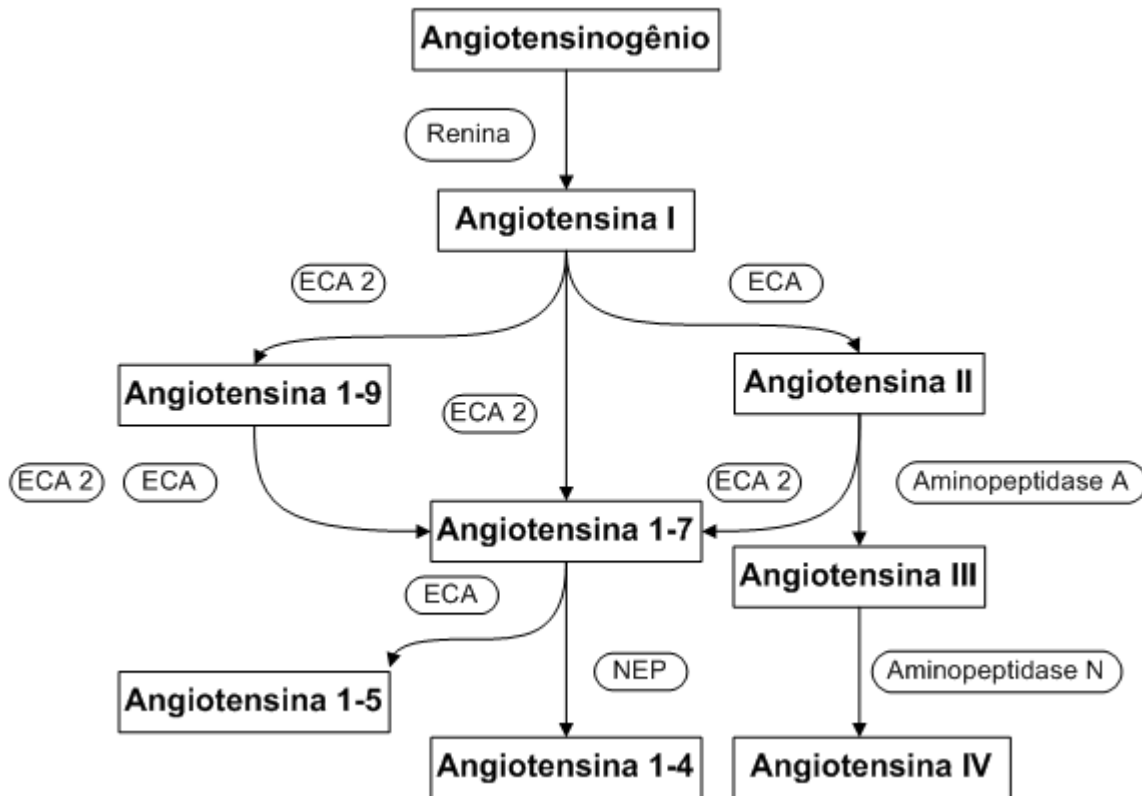


Figura 2: Sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA 2: enzima conversora de angiotensina 2; NEP: “neutral endopeptidase”

Em situações em que há estímulo prolongado, células da artéria interlobular podem ser recrutadas a liberar renina. (36) A pró- renina, que ainda não possui função bem esclarecida, pode ser secretada diretamente na circulação sistêmica, enquanto a renina é estocada e liberada por grânulos secretórios, quando há estímulo. (37) A renina, uma enzima proteolítica ativa, converte o angiotensinogênio, uma alfa-2-globulina, em angiotensina I (ang I), um decapeptídeo, no fígado. Posteriormente, a ang I é convertida em angiotensina II (ang II), um octapeptídeo, no pulmão, pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Além de converter ang I em ang II, a ECA também leva à degradação da bradicinina. A ang II tem ação através de dois receptores transmembrana acoplados à proteína G, o AT1 e o AT2. Atualmente, as ações da ang II mais conhecidas são pela ligação no receptor AT1, embora haja estudos sugerindo que as ações via receptor AT2

sejam antagônicas quando comparadas às ações via receptor AT1. Assim, alguns autores consideram, que o receptor AT2 seria um contra-regulador do receptor AT1. A ang II pertence à classe de hormônios que exercem sua ação hormonal através da seguinte cascata: a ligação do hormônio em seu receptor na membrana celular ativa uma proteína G estimulatória, levando ao aumento da atividade da fosfolipase C acoplada à membrana. Essa enzima leva à formação de dois compostos a partir do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2): o inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3, por sua vez, leva ao aumento da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e da captação de cálcio do meio extracelular. O aumento de cálcio intracelular desencadeia a fosforilação de algumas proteínas celulares e a ação hormonal. Os efeitos da ang II inicialmente descritos no receptor AT1 são predominantemente vasculares (vasoconstrição) e no túbulo renal (reabsorção de sódio e água e aumento do volume plasmático). Com relação às ações no receptor AT2, aventa-se que poderiam contribuir para as ações tubulares renais e para proliferação da parede das artérias, além do receptor AT2 antagonizar as ações do receptor AT1.(38) Atualmente, sabe-se que a ang I também pode ser convertida a ang II por outra enzima, a quimase, uma serina protease. Entretanto, a importância em gerar ang II a partir de ang I difere entre as espécies, sendo mais importante em humanos que em ratos. (39;40)

Estudos subsequentes descreveram que existem SRA locais e diversas outras ações e implicações para a ang II, tanto sistêmicas quanto parácrinas. (41) Assim a ang II é reconhecida como um peptídeo com ações diversas além das reguladoras do tônus vascular, com vasoconstrição e promoção de crescimento celular. Sabe-se atualmente também que a ECA está presente principalmente na membrana luminal das células endoteliais vasculares, mas também nos rins, adrenais, cérebro e outros órgãos. Existe ainda, uma enzima homóloga a ECA, a ECA 2 (42;43), que converte a ang I em angiotensina 1-9. Essa última não tem ação vascular específica, mas poderia ser convertida principalmente para angiotensina 1-7, que teria efeito vasodilatador e ações no SRA local de diversos órgãos, tais como rim, coração, pâncreas e cérebro. (44-46) Além disso, a angiotensina 1-7 poderia antagonizar os efeitos da ang II. (47;48)

A ECA 2 é predominantemente expressa no endotélio das veias coronarianas e intra-renais, epitélio renal e testículo. (49) Ao contrário da ECA, a ECA 2 não é inibida

pelos medicamentos da classe dos inibidores da ECA, além de não levar à degradação da bradicinina.

Os crescentes estudos sobre o SRA permitiram considerá-lo como um sistema modulador da resposta ao estresse (50) (Figura 3).

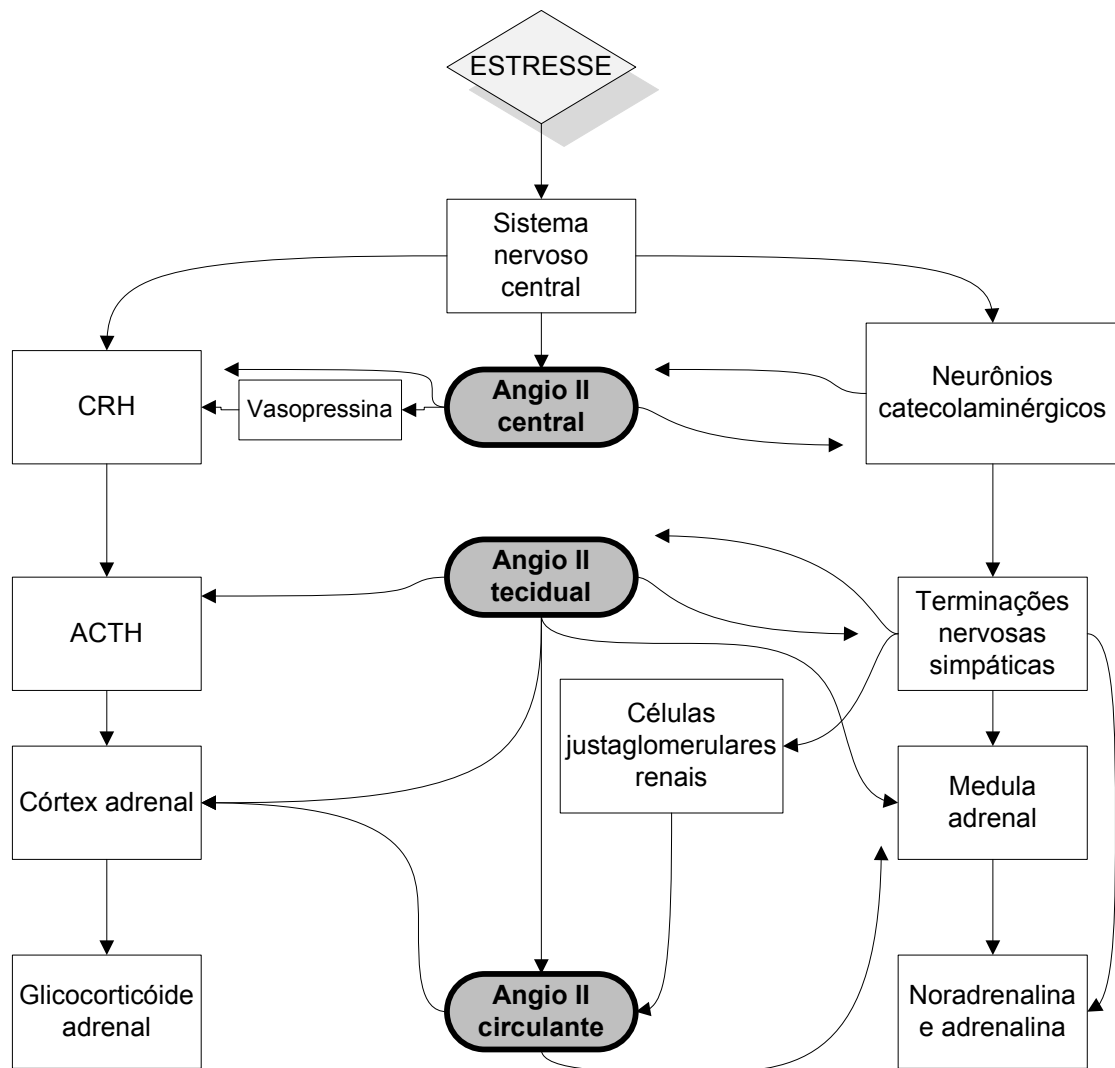


Figura 3: Adaptada da referência 46. Interação entre sistema renina-angiotensina e estresse.

A ang II encontra-se aumentada tanto a nível sistêmico, como a nível tecidual, em animais submetidos a estresse agudo e crônico, embora a ativação do SRA pareça ser mais intensa no estresse agudo. (50) A interação entre o SRA e o sistema simpático já foi previamente estudada. (41) A ang II, agindo em receptores AT1, facilita a liberação de

noradrenalina pelos gânglios simpáticos e, também, de adrenalina pelas células cromafins da medula adrenal, enquanto sua inibição por candersartan resultou em redução dessas ações da ang II. Há evidências também da participação do SRA na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A ang II agindo no sistema nervoso central leva à excitação dos neurônios catecolaminérgicos, estimulação da secreção de vasopressina e de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), bem como potencialização do ACTH. (50-52)

Estudo mostrou (53) que o estresse de contenção pode modular a expressão dos receptores de angiotensina no cérebro, hipófise e na adrenal. Dessa maneira, o SRA está implicado na regulação neuroendócrino metabólica da resposta ao estresse, havendo ativação dos receptores AT1 da angiotensina II nos núcleos paraventriculares, órgão subfornical e eminência média. Estudo sugere que as ciclooxygenases 1 e 2, além da óxido nítrico sintase, atuem na ativação mediada pelo estresse de imobilização dos núcleos paraventriculares.(54)

A presença de SRA local foi reconhecida nas últimas décadas, com importância clínica significativa. O SRA local foi identificado em diversos órgãos, tais como tecido adiposo, placenta, osso, cérebro e músculo.(55) O SRA intrínseco do pâncreas de rato foi determinado por Leung e colaboradores. (56) Nesse trabalho, detectou-se a expressão de RNA mensageiro de angiotensinogênio, renina e receptores AT1 e AT2. Detectou-se também a proteína angiotensinogênio nos ductos e vasos pancreáticos por “Western blotting” e imunohistoquímica. A presença de ang II e de seus receptores no pâncreas já havia sido previamente demonstrada em trabalhos anteriores desse mesmo grupo de pesquisadores. O SRA possui funções autócrinas, parácrinas e isso confere a esse sistema diversas ações, tais como: regulação do ciclo celular, geração de espécies reativas de oxigênio, inflamação tecidual, fibrose, além de ação hormonal. (57)

Dessa maneira, há crescente evidência da importância do SRA na regulação metabólica e, inclusive, no metabolismo de carboidratos. (58-60) Pesquisas nessa área investigaram o efeito do bloqueio do receptor AT1 da ang II. Machado e colaboradores atribuíram os efeitos hiperglicêmicos da ang II às suas ações nos receptores AT1, sugeriram que esses efeitos são dose-dependentes e que há melhora na resposta hiperglicêmica ao

estresse agudo hemorrágico após infusão de losartan, um antagonista do receptor AT1 da ang II. (61) Üresin e colaboradores mostraram prevenção da hiperglicemia estresse-mediada com a utilização de losartan por via oral, antes da submissão ao estresse de imobilização crônico. (62) No estresse de isolamento em ratos, o bloqueio por antagonistas de receptores AT1 periféricos e cerebrais, administrados perifericamente, preveniu a resposta hormonal e simpática adrenal, alterações corticais e em receptores do complexo GABA relacionadas ao estresse e reduziu a ansiedade em ratos (63) Estudo realizado com ilhotas pancreáticas de ratos diabéticos evidenciou a melhora da função dessas com o bloqueio do SRA, provavelmente devido à melhora do estresse oxidativo, fibrose e apoptose.(64)

Os inibidores da ECA (i-ECA) formam um grupo de medicamentos largamente utilizado como anti-hipertensivos, nas terapias da insuficiência cardíaca e da nefropatia diabética. Sua ação principal seria inibir a ECA, resultando em redução da conversão de ang I para ang II. Outro efeito dessa classe de medicamentos seria aumentar os níveis de bradicinina, pela inibição da degradação da bradicinina mediada pela cininase II. Além disso, poderia ocorrer maior conversão de ang I em angiotensina 1-7. Alguns estudos têm investigado se os i-ECA poderiam reduzir o risco de diabetes ou se teriam interferência na função da célula beta pancreática e na resistência insulínica. (65-68) Uma vez que o enalapril é uma medicação comumente utilizada em diversas condições clínicas, há evidência de potencial benefício no metabolismo de carboidratos, esse trabalho poderá acrescentar informações a respeito da modulação do SRA em situação de estresse. Isso porque, apesar do crescente interesse nessa área e de estudos prévios sugerindo melhora hiperglicêmica com o bloqueio de receptor de angiotensina e i-ECA, poucos são os estudos que procuram elucidar a modulação dos i-ECA no metabolismo de carboidratos em situação de estresse.

## **OBJETIVOS**

Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do bloqueio crônico do SRA, pelo tratamento com enalapril (uma medicação da classe dos i-ECA), sob a glicose e insulina plasmáticas em ratos submetidos ao estresse agudo de contenção. Uma vez que se demonstrou a existência de SRA local, suas possíveis ações a nível pancreático, sua interação com o estresse, com o sistema simpático e ativação neuroendócrina, esse trabalho tem como objetivo específico avaliar a seguinte hipótese de que, bloqueando cronicamente o SRA com enalapril, possamos verificar possíveis benefícios na resposta glicêmica e insulinêmica ao estresse agudo de contenção em ratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Considerações éticas**

Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG): protocolo 006/04 (anexo I).

### **Delineamento experimental**

#### **Animais**

Nos experimentos foram utilizados ratos Holtzman, machos, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina - UFMG. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração padronizada e foram mantidos sob controle de temperatura e de luz (com aproximadamente 12 horas de luz ao dia). Ao atingirem o peso entre 100 e 155g, os ratos foram colocados em gaiolas individuais e manuseados diariamente, por 14 dias, para coleta de dados relativos ao projeto (peso e ingestão de solução de enalapril ou veículo), tendo atingido peso final entre 150 e 200 g.

### **Tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina (enalapril) versus veículo**

O tratamento crônico com inibidor de enzima conversora de angiotensina (i-ECA) foi realizado com enalapril (Merck), na dose de 10mg/kg de peso/dia, por meio de solução a 5%, via oral, oferecida livremente, durante 14 dias. Esse protocolo de tratamento foi padronizado por Britto e colaboradores, com dose de 10mg/kg de peso/dia como dose de bloqueio eficaz da enzima conversora de angiotensina, (69) além de já ter sido previamente utilizado em nosso laboratório. (18) Os animais controles foram tratados com água (veículo) *ad libitum*. Miranda e colaboradores (cols.) demonstraram que não houve diferença na aceitação da solução de enalapril em relação ao veículo. (18)

Uma hora antes do experimento (estresse de contenção), os animais tratados com enalapril, receberam dose única endovenosa de 5mg/kg enalapril diluído em soro fisiológico 0,9% (solução a 5%). (69) Essa dose foi utilizada a fim de garantir altos níveis

plasmáticos de enalapril durante o estresse de contenção. Os animais do grupo controle (tratados com veículo) receberam uma dose única endovenosa de salina 0,9%.

Para avaliar o efeito do tratamento crônico com i-ECA sobre o peso e aderência aos líquidos oferecidos (solução com i-ECA ou veículo), o peso e a ingestão hídrica dos animais foram anotados diariamente (apresentados no apêndice I).

### **Coleta de sangue**

Dois dias antes do experimento, os animais foram anestesiados com éter. Um cateter de silastic (0,5mm DI, 0,94mm DE, N° 602-135, Down Corning Corporation, Auburn, Michigan, USA) foi implantado no átrio direito de cada rato, através da veia jugular externa. (70) Este cateter, com utilidade de coletar sangue, administrar medicação e repor salina no dia do experimento, foi exposto no dorso e preenchido com salina fisiológica heparinizada (Liquemine, Roche, 25 UI/ml, 1 ml). No dia do experimento, foi adaptada, ao cateter atrial uma conexão de polietileno P50, medindo 40 cm de comprimento, também preenchida com salina fisiológica heparinizada (10 UI/ml).

Após uma hora de adaptação, foi colhida amostra basal de cada animal, utilizando-se seringas com citrato de sódio, sendo em seguida realizado o estresse de contenção, com novas coletas de 0,5 ml aos 5, 10, 20 e 30 minutos (min.). O grupo de animais não estressado também teve amostras sanguíneas coletadas conforme o mesmo protocolo (basal, 5, 10, 20 e 30 min.).

As amostras sanguíneas coletadas foram de 0,5 ml em cada tempo do experimento, sendo, em seguida, repostos 0,5 ml de salina a 0,9%, não apresentando efeito hemodinâmico significativo. (71)

### **Grupos experimentais**

Os experimentos foram realizados no período entre 8:00 e 12:00 horas, no Laboratório de Pesquisas em Endocrinologia da Universidade Federal de Minas Gerais, em sala com controle de ruídos e de temperatura. Durante esse período, os animais permaneceram em jejum, dentro de suas gaiolas individuais até o início do estresse de contenção. Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: ratos cronicamente tratados com i-ECA e submetidos ao estresse de contenção – 8 animais (EC); ratos



cronicamente tratados com veículo e submetidos ao estresse de contenção– 9 animais (VC); ratos cronicamente tratados com i-ECA e não submetidos ao estresse –6 animais (ES).

### **Estresse de contenção**

Nesse trabalho, utilizamos restrição dos movimentos do animal, colocando-o dentro de um tubo de plástico PVC, deixando um orifício para o animal respirar e para a cauda, além de uma abertura próxima a cabeça do animal, apenas para a passagem da cânula utilizada para as dosagens de amostras sanguíneas. Essa técnica de estresse de contenção já foi utilizada em outros trabalhos, inclusive em nosso laboratório. O estressor, especialmente confeccionado para a realização dos experimentos, tinha as seguintes dimensões: 21,0cm de comprimento por 4,5cm de diâmetro, com o qual foi possível produzir alto grau de desconforto, sem dor aparente. (Figura 4).



Figura 4: Estressor de contenção utilizado nesse trabalho

### **Métodos de Análise Química**

As amostras sanguíneas, colhidas em seringas citratadas, foram mantidas em gelo até a centrifugação (900 G; 20 minutos) à temperatura de 4°C. O plasma foi separado e estocado a menos 80°C até as análises bioquímicas.

### **Determinação da glicose e insulina plasmáticas**

A glicose plasmática foi determinada em duplicata pelo método de glicose-oxidase (GOD-ANA, CENTERLAB, Santa Luzia, Minas Gerais, Brasil). A insulina plasmática foi dosada em duplicata por radioimunoensaio (SRI-13K, Linco Research, St. Charles, Missouri, USA) com insulina de rato marcada com I<sup>125</sup> e anticorpo anti-insulina de rato. O coeficiente de variação intra-amostral foi de 5% para a dosagem de insulina, sendo que, todas as amostras de insulina foram dosadas em um único ensaio.

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a análise estatística, foram utilizados: o programa Prisma (GraphPad 5, La Jolla, CA, USA). OS resultados foram previamente testados para a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As amostras colhidas antes e após o estresse de contenção, de cada grupo, foram comparadas pelo teste *t*-Student pareado. As diferenças entre os grupos durante o estresse de contenção foram determinadas pela análise de variância de medidas repetidas e confirmadas pelo pós-teste de Bonferroni. As áreas sob a curva de glicose e insulina plasmáticas foram calculadas no mesmo programa e a comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância simples, e também seguida do pós-teste de Bonferroni. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

### Efeitos do estresse de contenção na glicose plasmática

Como ilustrado na figura 5A, as glicemias basais dos grupos em estudo (EC, VC e ES) não demonstraram diferença estatística para todas as comparações realizadas ( $72,9 \pm 3,8$  mg/dl;  $79,8 \pm 3,1$ mg/dl;  $74,2 \pm 3,6$  mg/dl;  $P > 0,05$ ).

Após o início do estresse de contenção, os ratos apresentaram aumento progressivo das glicemias durante o experimento, significativo a partir dos 5 min., no grupo tratado com enalapril e submetido ao estresse de contenção (EC) ( $96,5 \pm 3,4$  mg/dl;  $P < 0,01$ ), atingindo pico em 20 min. ( $117,4 \pm 11,9$  mg/dl  $P < 0,05$ ). No grupo tratado com veículo e submetido ao estresse de contenção (VC), houve elevação significativa da glicemia, a partir dos 10 min., coincidindo com o pico hiperglicêmico deste grupo ( $113,6 \pm 12,9$  mg/dl;  $P < 0,05$ ). Em ambos os grupos a glicemia se manteve estatisticamente diferente em relação ao basal até o final do experimento.

No grupo controle tratado com enalapril e não submetido ao estresse (ES), não houve diferença estatística nos valores plasmáticos de glicemia durante todo o experimento ( $P > 0,05$ ).

A análise de variância de medidas repetidas não revelou diferença significativa entre as glicemias dos grupos EC, VC e ES, quando analisado o experimento como um todo ( $P > 0,05$ ), confirmada pela comparação das áreas sob as curvas de glicemias que não demonstrou diferença estatística entre os três grupos em estudo ( $P > 0,05$ ), como ilustrado na figura 5B.

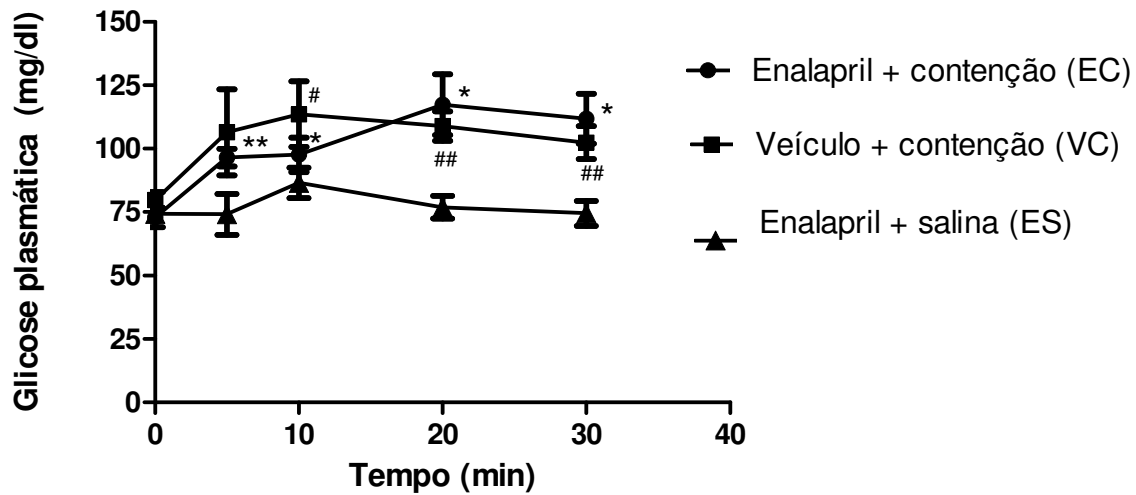


Figura 5A: Efeitos do estresse de contensão nos níveis de glicemia plasmática (valores absolutos) em ratos cronicamente tratados com enalapril. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  erros padrões das observações individuais para cada uma dos grupos: EC: estresse + contensão (8 ratos cronicamente tratados com enalapril e submetidos ao estresse de contensão; VR: (9 ratos cronicamente tratados com veículo e submetidos ao estresse de contensão); ES (6 ratos cronicamente tratados com enalapril e submetidos à infusão de salina e não submetidos ao estresse). \*  $P < 0,05$  para as comparações com nível basal de EC. \*\*  $P < 0,01$  para as comparações com nível basal de EC. #  $P < 0,05$  para as comparações com nível basal de VC. ##  $P < 0,01$  para as comparações com nível basal de VC.

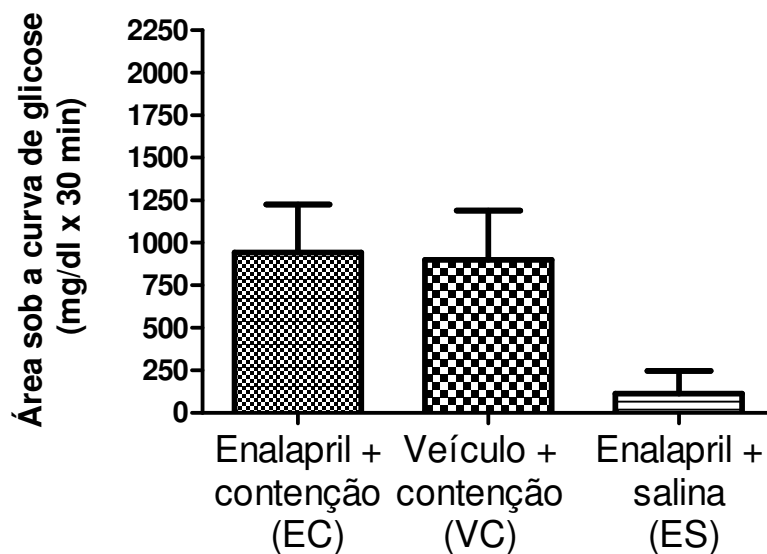


Figura 5B: Representação gráfica das áreas sob as curvas de glicose. Os valores representam as médias  $\pm$  os erros padrões das áreas dos grupos de estudo. Não houve diferença estatística quando as áreas sob as curvas de glicose dos grupos EC, VC e ES foram comparadas.

### Efeitos do estresse de contensão na insulina plasmática

Conforme o ilustrado pela figura 6A, os valores de insulina plasmática basais não apresentaram diferença estatística entre os grupos em estudo (EC, VC e ES), para todas as comparações realizadas ( $0,4 \pm 0,1$ ;  $0,7 \pm 0,3$ ;  $0,3 \pm 0,1$  ng/ml;  $P > 0,05$ ).

No grupo tratado com enalapril e submetido ao estresse de contensão (EC), houve importante aumento dos níveis de insulina plasmática, com tendência à significância aos 10 min. ( $P = 0,09$ ), mas estatisticamente significativo aos 20 min. ( $1,89 \pm 0,51$  ng/ml;  $P = 0,02$ ). No grupo tratado com veículo e submetido ao estresse de contensão (VC), houve leve incremento nos níveis de insulina plasmática, com pico em 20 min. ( $1,17 \pm 0,38$  ng/ml;  $P < 0,05$ ). Em ambos os grupos, EC e VC, após o pico de insulina plasmática, houve redução dos níveis plasmáticos de insulina, tendendo ao retorno aos valores basais em 30 min.

No grupo controle tratado com enalapril e não submetido ao estresse (ES), não houve diferença estatística nos valores plasmáticos de insulina durante todo o experimento ( $P > 0,05$ ).

A análise de variância de medidas repetidas não revelou diferença significativa entre a secreção de insulina dos grupos EC, VC e ES, quando analisado o experimento como um todo ( $P > 0,05$ ). Entretanto, na análise de variância simples das áreas sob as curvas de insulina, comprovou-se um maior incremento da área sob a curva de insulina do grupo EC, em comparação aos demais grupos ( $P=0,01$ ). Essa diferença estatística entre os grupos EC versus VC e EC versus ES foi confirmada pelo pós-teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ , para ambas as comparações). (Figura 6B)

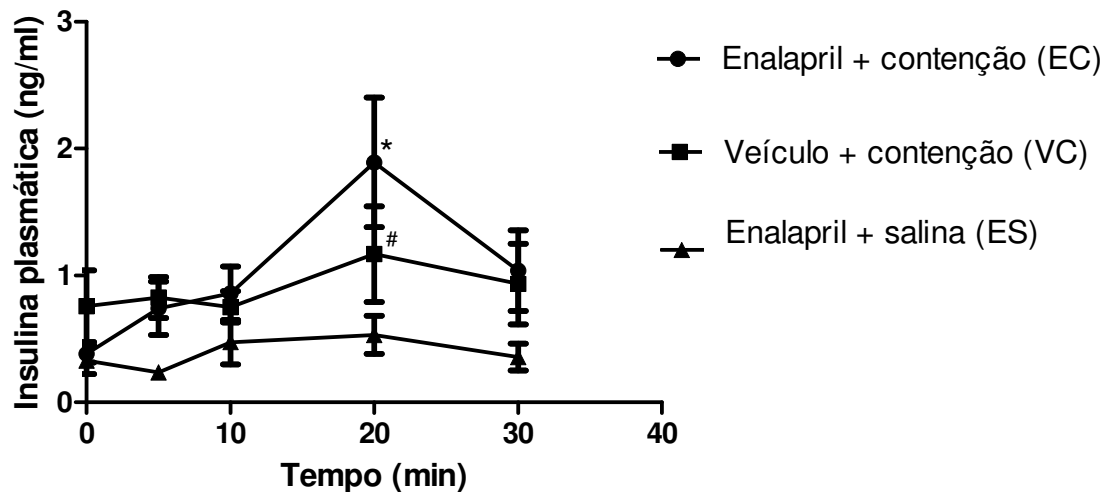


Figura 6A: Efeitos do estresse de contenção nos níveis de insulina plasmática (valores absolutos) em ratos cronicamente tratados com enalapril. Os valores representam as médias  $\pm$  erros padrões das observações individuais para cada grupo de estudo: EC: estresse + contenção (8 ratos cronicamente tratados com enalapril e submetidos ao estresse de contenção); VR: (9 ratos cronicamente tratados com veículo e submetidos ao estresse de contenção); ES (6 ratos cronicamente tratados com enalapril e submetidos à infusão de salina e não submetidos ao estresse). \*  $P < 0,05$  para as comparações com nível basal de EC. #  $P < 0,05$  para as comparações com nível basal de VC.

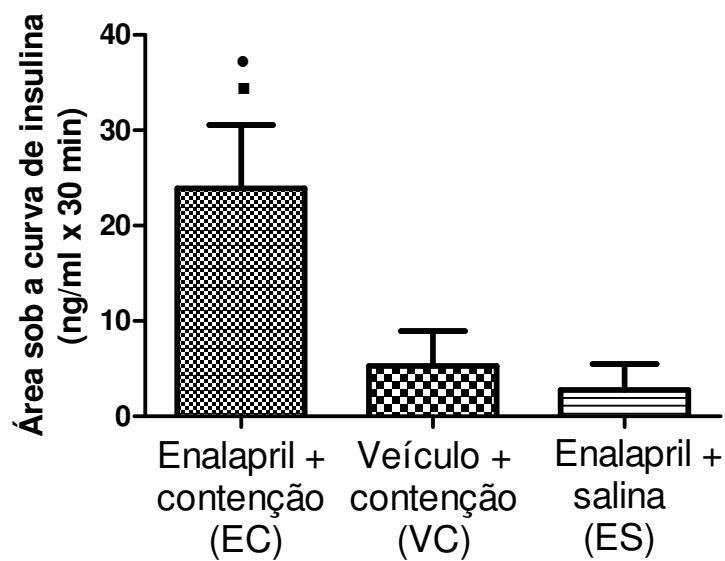


Figura 6B: Representação gráfica das áreas sob as curvas de insulina. Os valores representam as médias  $\pm$  os erros padrões das áreas sob as curvas de insulina de cada grupo de estudo. ●  $P < 0,05$  para comparação entre EC e VC; ■  $P < 0,05$  para comparação entre EC e ES.

## DISCUSSÃO

O estímulo por um agente estressor desencadeia mecanismos compensatórios, a fim de restabelecer o estado de equilíbrio, genericamente denominado homeostase. Entretanto, ao tentar restabelecer o estado basal, ou seja, prévio ao estímulo estressor, por vezes podem ser desencadeadas respostas exageradas, assim determinando algumas vezes situações novas e, por vezes, danosas ao organismo. Nesse contexto, estudos vêm tentando compreender as vias de ativação desencadeadas pelo estresse, a fim de que, uma vez elucidadas, seja possível modulá-las, a ponto de obter-se uma melhor adaptação do organismo às diversas situações de estresse. As respostas adaptadoras ao estresse ocorrem por mecanismos comportamentais, autonômicos e neuroendócrinos.

Alguns fatores contribuem para a hiperglicemia induzida pelo estresse. Assim, existe aumento da liberação hepática de glicose pela glicogenólise e gliconeogênese. Além disso, há redução da captação periférica de glicose pelos tecidos. Yamada e cols. (29) sugerem que, em condições de jejum e estresse por imobilização, a principal fonte de incremento na glicemia seria pela ação da epinefrina que estimularia a gliconeogênese hepática. Em situações em que os animais não tiveram restrição da alimentação, epinefrina, glucagon e corticosterona agem sinergicamente contribuindo para a hiperglicemia induzida pelo estresse.

Em nosso trabalho, os ratos tiveram restrição da alimentação apenas durante o experimento, o que indica não ter havido depleção do estoque de glicogênio hepático. A glicemia basal não foi significativamente diferente entre os três grupos em estudo: EC (enalapril + contenção); VC (veículo + contenção) e ES (enalapril + salina). No grupo não submetido ao estresse (ES), não houve variação glicêmica significativa durante o experimento, enquanto que, nos grupos estressados EC e VC, houve hiperglicemia significativa, já aos 5 e 10 minutos, respectivamente. Esses achados indicam que, como houve hiperglicemia precoce, pode ter ocorrido liberação rápida dos estoques hepáticos, ocasionada pela liberação rápida de catecolaminas. Observamos um pico de hiperglicemia mais precoce no grupo VC (aos 10 minutos), em comparação com o EC (aos 20 minutos), embora a análise estatística das curvas de glicemia não tenha revelado significância estatística. As áreas sob as curvas de glicose não diferiram entre os grupos em estudo.



Sabe-se que diferentes modelos de estresse podem influenciar a homeostase de maneiras diversas e em intensidades diferentes. Assim, há modelos de estresse que ocasionam principalmente uma alteração metabólica, enquanto o estresse de contenção pode ser considerado um modelo misto, em que há alteração metabólica, mas também psicossocial, determinando uma hiperglicemia menos intensa (25) do que em outros modelos de estresse previamente estudados pelo nosso laboratório, como o neurocitoglicopênico. (18;19) O fato do estresse de contenção ocasionar uma hiperglicemia mais branda em comparação com outros tipos de estresse pode ter sido a razão pela qual não houve significância estatística entre as áreas sob as curvas de glicose. Apesar disso, em relação à glicemia basal, os grupos estressados tiveram incremento estatisticamente significativo da glicemia e compatível com outros estudos que utilizaram o mesmo modelo de estresse. (25)

Em ambos os grupos EC e VC, observamos um pico na secreção de insulina aos 20 minutos, enquanto que, ES não apresentou variação estatisticamente significativa nos níveis de insulina plasmática durante os 30 minutos de experimento. Embora com um pico hiperglicêmico mais tardio em EC quando comparado com VC, EC apresentou um incremento na secreção de insulina progressivo, desde o início do experimento, em comparação com um aumento mais gradativo em VC. A área sob a curva de EC mostrou-se significativamente maior quando comparada com a de VC. Esses dados sugerem que tenha ocorrido uma maior estimulação da secreção de insulina, glicose mediada no grupo EC. Quando comparamos EC com ES, também observamos uma área sob a curva de insulina significativamente maior em EC. Isso se deve ao fato de que EC foi submetido ao estresse de contenção e teve hiperglicemia que estimulou a secreção de insulina, enquanto que em ES não houve alteração da glicemia e nem da secreção de insulina durante todo o experimento, já que esse grupo não foi submetido ao estresse. Entretanto, a área sob a curva de VC não foi estatisticamente diferente quando comparada à de ES. Uma possível explicação para essa ausência de diferença estatística seria pelo fato da hiperglicemia apresentada pelo grupo VC ter estimulado menos a secreção de insulina do que em EC. Assim, embora tenha havido um aumento da secreção de insulina glicose-mediada em VC, esse incremento não foi tão elevado a ponto de ser demonstrado na análise estatística.

A participação do sistema renina angiotensina (SRA) na regulação metabólica tem sido um assunto de interesse crescente na atualidade. Evidências sugerem que os inibidores

do SRA poderiam ter benefícios no metabolismo de carboidratos. Entretanto, a interação entre SRA e metabolismo de carboidratos não é completamente conhecida e poucos estudos avaliaram a modulação do SRA no estresse agudo, situação em que o SRA tem ativação importante. Estudo prévio em nosso laboratório reforçou importância da modulação do SRA na resposta ao estresse neurocitoglicopênico, particularmente na secreção de insulina glicose estimulada. No atual trabalho, houve inibição crônica do SRA por enalapril, uma medicação da classe dos i-ECA, comumente utilizada na prática médica. O fato de ter ocorrido uma maior secreção de insulina no grupo EC, em comparação a VC, sugere que o enalapril estimule a secreção de insulina glicose mediada no estresse de contenção agudo, assim como previamente demonstrado no estresse por neurocitoglicopenia. (18)

Nas últimas décadas, evidências têm sido acumuladas sobre a modulação do sistema nervoso na função pancreática (66;72). Steffens (7) mostrou que a infusão de norepinefrina no hipotálamo ventro-medial estimula a secreção de glucagon mediada pelo sistema nervoso simpático, enquanto que a infusão da mesma no hipotálamo lateral resulta em estímulo da secreção de insulina, provavelmente mediada pelo sistema nervoso parassimpático. Este autor concluiu que a ativação dessas áreas do hipotálamo pode alterar a regulação glicêmica. Smythe e cols. (31) estudaram a relação entre atividade noradrenérgica e glicemia, mostrando que essa relação é linear e pode ter modulação independente da adrenal ou hipófise. Sabe-se que o estresse de contenção estimula áreas do sistema límbico. Leong (53) demonstrou que esse modelo de estresse agudo, mais do que o crônico, altera a expressão dos receptores da ang II a nível cerebral, hipofisário e adrenal, levando à maior ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Esse autor sugere ainda que há regulação para baixo dos receptores AT<sub>2</sub> e que há regulação para cima dos receptores AT<sub>1</sub>, resultando em aumento da liberação de catecolaminas pela medula adrenal. Em nosso trabalho, embora em EC a hiperglicemia tenha sido detectada mais precocemente, aos 5 minutos, houve um pico glicêmico mais tardio neste grupo (aos 20 minutos) do que em VC (aos 10 minutos). O bloqueio crônico do SRA pode ter determinado uma liberação mais gradual de catecolaminas em EC, levando à elevação menos súbita da glicemia estimulada pelo estresse.

O aumento na secreção de insulina glicose mediada, significativamente maior em EC que em VC, pode ter ocorrido devido ao bloqueio crônico do SRA e vários mecanismos

podem estar implicados, tanto por efeitos diretamente relacionados a ang II, como por efeitos indiretos desse peptídeo.

Machado e colaboradores (61) sugeriram que a ang II determina um efeito hiperglicêmico mediado por sua ação no receptor AT1 e que a hiperglicemia poderia ser prevenida pela administração de losartan, antagonista do receptor AT1 da ang II. Carlsson e colaboradores (73) estudaram os efeitos da ang II em reduzir o fluxo sanguíneo pancreático, possivelmente afetando a primeira fase de secreção de insulina. Esses efeitos foram revertidos por administração de enalaprilato (um metabólito ativo do enalapril) e de saralasinina (um antagonista da ang II). Nosso trabalho corrobora essa hipótese, pois também houve aumento da secreção de insulina no grupo tratado com enalapril.

Além disso, a ang II pode elevar a liberação de norepinefrina pelos neurônios adrenérgicos, de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal, bem como estimular os gânglios autonômicos do sistema nervoso periférico. Baseando-se no fato de que a tirosina hidroxilase é uma enzima limitante na síntese de catecolaminas, que sua atividade está aumentada no estresse, e que há interação entre a ang II e células cromafins, (74) Talas e cols. propuseram que o enalapril pode prevenir o aumento da atividade da tirosina hidroxilase na medula adrenal de ratos expostos ao estresse por frio. (75) No presente trabalho, nos animais tratados cronicamente com enalapril e submetidos ao estresse de contenção, o enalapril pode ter atenuado a inibição da secreção de insulina mediada pela noradrenalina.

Mecanismos alternativos também podem estar implicados, principalmente considerando que o enalapril reduz os níveis de ang II e aumenta os níveis de angiotensina 1-7 e de bradicinina. Há evidências de que a bradicinina possui ação através de ligação aos receptores de membrana celular acoplados à proteína G (receptores B1 e B2, embora com predomínio do último), aumentando a ativação da óxido nítrico sintetase, ativando via dependente de cálcio e ocasionando elevação dos níveis de óxido nítrico. (76) Beard e colaboradores estudaram o efeito da bradicinina em elevar a captação de glicose insulina estimulada em adipócitos a partir da óxido nítrico sintetase e inibição da cinase Jun NH2-terminal. (77) O efeito da modificação nos níveis da bradicinina pode ter resultado em melhora do fluxo sanguíneo para a ilhota pancreática, com aumento do influxo de cálcio e, conseqüentemente, da secreção de insulina glicose mediada. Etgen e colaboradores (78)

sugerem que o óxido nítrico seja capaz de aumentar a captação de glicose pelas células musculares, inclusive aventando a hipótese de haver aumento de transportadores de glicose na superfície celular. Além disso, Masori e cols. (79) estudaram a associação da ang II com a desorganização dos filamentos da actina, nas células do músculo liso vascular, o que resultou em maior internalização dos transportadores de glicose e consequente redução da captação de glicose. No caso deste estudo, um dos mecanismos possíveis poderia ser o aumento de transportadores de glicose da célula beta do rato (GLUT 2) pelo bloqueio do SRA, com consequente aumento da captação de glicose e incremento da secreção de insulina glicose mediada pela célula beta. (Figura 7)

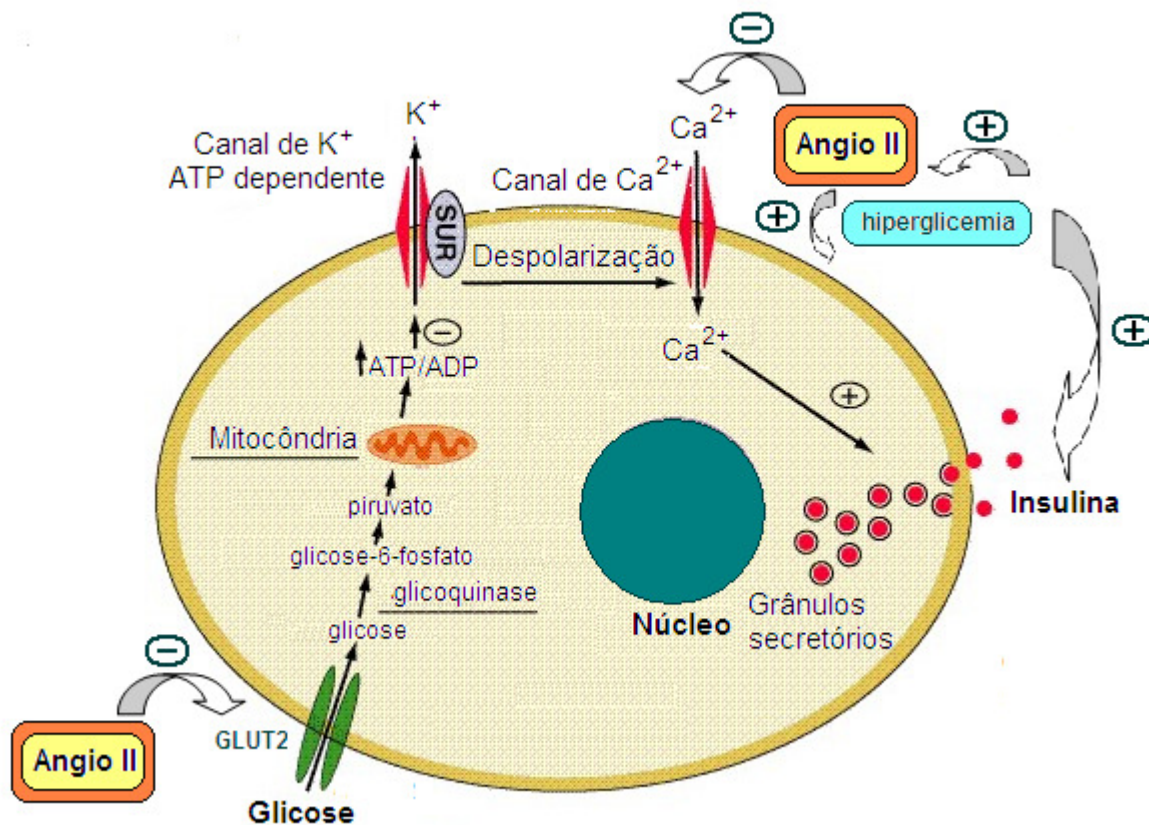


Figura 7: Célula beta pancreática, secreção de insulina e possíveis modulações da angiotensina II.

Quando bloqueia-se o SRA com medicamento da classe dos i-ECA, como o enalapril, ocorre bloqueio da enzima ECA, que possui função principal de converter ang I em ang II. Com o bloqueio da ECA, haverá redução da formação de ang II e acúmulo de ang I. Essa última pode ser convertida para angiotensina 1-7. Evidências indicam que a angiotensina 1-7 possa ter uma ação de antagonismo parcial da ang II, resultando em vasodilatação e melhora do estresse oxidativo. Zhu e colaboradores (47) sugerem ainda que o antagonismo parcial da angiotensina 1-7 na ação da ang II seja por inibição da tradução do sinal da ang II. Dessa maneira, o bloqueio da conversão de ang I em ang II, e consequente aumento da conversão de ang I em angiotensina 1-7, poderia ter efeitos no metabolismo glicêmico, tais como aumento do fluxo sanguíneo para a célula beta e redução do estresse oxidativo dessa. Isso poderia resultar em uma maior secreção de insulina por melhora da função da célula beta, podendo ser um dos possíveis mecanismos envolvidos no aumento de secreção de insulina evidenciado em nosso trabalho.

Alguns cientistas demonstram a presença de moléculas do SRA nas ilhotas pancreáticas e que sua expressão depende da concentração de glicose. Além disso, estudos recentes sugerem que o tratamento das ilhotas pancreáticas humanas com i-ECA poderia protegê-las da glicotoxicidade e elevar a secreção de insulina. (80;81) Kampf e colaboradores (82) sugerem que a inibição do receptor AT1 da ang II possa resultar em melhora da primeira fase de secreção de insulina. Dessa maneira, neste estudo, mesmo com hiperglicemia desencadeada pelo estresse de contenção e seu potencial efeito deletério sob a secreção de insulina, pela possível glicotoxicidade, a inibição do SRA poderia ter ocasionado melhora desta última, com consequente aumento da secreção de insulina glicose mediada. (Figura 8).

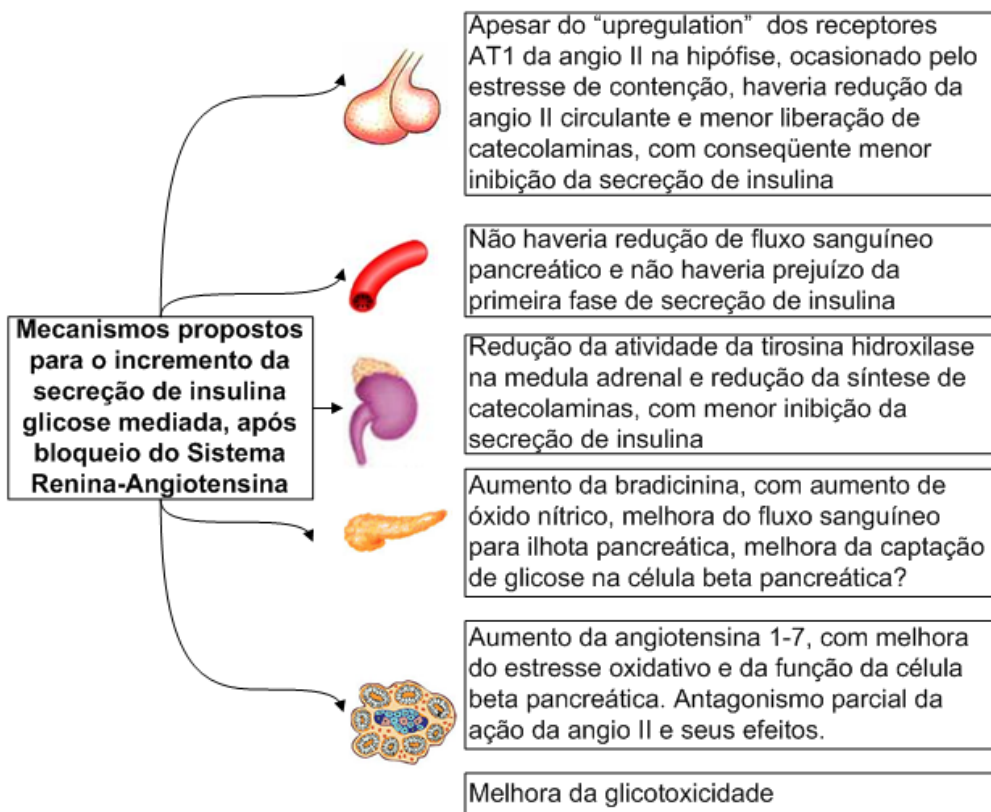


Figura 8: Mecanismos propostos para incremento da insulina glicose mediada, após bloqueio do sistema renina-angiotensina.

Este estudo mostra pela primeira vez a influência do tratamento crônico com enalapril no metabolismo de carboidrato de ratos submetidos ao estresse agudo de contenção (apêndice II). As alterações mostradas nesse estudo poderiam simular, em humanos, situações de ansiedade súbita ou de evento estressante imprevisível. Esses dados reforçam os achados prévios de um estudo, no estresse agudo por neurocitoglicopenia, estresse esse que evoca resposta hiperglicêmica mais exacerbada (apêndice III). Assim, os dados desses dois últimos estudos sugerem que as alterações mediadas pelo tratamento crônico com enalapril no metabolismo de carboidrato ocorrem em diferentes modelos de estresse, mesmo determinando impactos diversos no sistema nervoso autônomo e na liberação de catecolaminas. Ambos os modelos de estresse neurocitoglicopênico e de contenção estimulam os núcleos paraventriculares e área hipotalâmica lateral, embora a ativação dessas áreas seja mais intensa no estresse de contenção, além deste último ativar

mais intensamente também o sistema límbico. (1) Além disso, o estresse de contenção agudo causa ansiedade e simula em humanos o estresse psicossocial. (24) Enquanto os níveis plasmáticos de norepinefrina predominam no estresse de contenção, os de epinefrina são maiores no de neurocitoglicopenia. (1) O estresse de neurocitoglicopenia leva à hiperglicemia mais intensa em comparação ao estresse de contenção, possivelmente por este último causar resposta adrenérgica menos intensa que o primeiro.

Os i-ECA têm, atualmente, uma aplicação prática ampla, fazendo parte do arsenal terapêutico de pacientes hipertensos, além de cardiopatas e nefropatas, mesmo quando normotensos. Assim, as descobertas nos últimos anos têm revelado o potencial dos i-ECA, muito além do controle do nível pressórico. (83-86) Sabe-se que a prevalência de diabetes no mundo atual é alta e que a perspectiva é de que essa aumente, principalmente pelo aumento da prevalência de obesidade. Assim, uma implicação prática de nossos achados é que a inibição do SRA possa alterar a resposta neuroendócrina ao estresse agudo psicossocial presente no cotidiano dos indivíduos. Mais especificamente, a inibição do SRA poderia levar ao aumento da resposta secretória de insulina pela célula beta, em resposta ao estresse agudo psicossocial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Rev* 2001 Aug;22(4):502-48.
- (2) Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 1936;138:32.
- (3) Henry JP. Biological Basis of the Stress Response. *News Physiol Sci* 1993;8:69-73.
- (4) Cryer PE, Gerich JE. Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1985 Jul 25;313(4):232-41.
- (5) Robinson PJ, Papoport S. Glucose transport and metabolism in the brain. *Am J Physiol* 1986;250:127-36.
- (6) Miller RE. Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocrine Rev* 1981;2(4):471-94.
- (7) Steffens AB. The modulatory effect of the hypothalamus on glucagon and insulin secretion in the rat. *Diabetologia* 1981 Mar;20 Suppl:411-6.
- (8) Berthoud HR, Powley TL. Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia. *J Auton Nerv Syst* 1993 Feb;42(2):153-69.
- (9) Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocrine Rev* 2001 Oct;22(5):565-604.
- (10) De Boer SF, de BR, Slangen JL, Van der Gugten J. Dynamics of plasma catecholamine and corticosterone concentrations during reinforced and extinguished operant behavior in rats. *Physiol Behav* 1990 Apr;47(4):691-8.
- (11) Yamaguchi N. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can J Physiol Pharmacol* 1992 Feb;70(2):167-206.
- (12) Yamada F, Pacak K, Palkovits M. Stress induced hyperglycemia and hormones. *Endocrinology* 1993;222(4):502-48.
- (13) Lang J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 1999;259:3-17.
- (14) Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 2009 May;52(5):739-51.



- (15) Tengholm A, Gylfe E. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:58-72.
- (16) Konarska M, Stewart RE, McCarty R. Sensitization of sympathetic-adrenal medullary responses to a novel stressor in chronically stressed laboratory rats. *Physiol Behav* 1989 Aug;46(2):129-35.
- (17) Dronjak S, Jezova D, Kvetnansky R. Different effects of novel stressors on sympathoadrenal system activation in rats exposed to long-term immobilization. *Ann N Y Acad Sci* 2004 Jun;1018:113-23.
- (18) Miranda PAC, Simões e Silva AC, Longo JRO, Madureira MM, Foscolo RB, Machado LJ, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition changes the metabolic response to neuroglucopenic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011 Jan 28.
- (19) Ribeiro-de-Oliveira A, Jr., Guerra RM, Foscolo RB, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Effects of chronic bromocriptine (CB-154) treatment on the plasma glucose and insulin secretion response to neurocytopenia in rats. *J Endocrinol* 1999 Aug;162(2):237-42.
- (20) Reis FM, Ribeiro-de-Oliveira A, Jr., Guerra RM, Reis AM, Coimbra CC. Blood glucose and prolactin in hyperprolactinemic rats exposed to restraint and surgical stress. *Life Sci* 1996;58(2):155-61.
- (21) Reis FM, Santos MA, Reis AM, Coimbra CC. Effects of hyperprolactinemia on plasma glucose and prolactin in rats exposed to ether stress. *Physiol Behav* 1994 Sep;56(3):495-9.
- (22) Ribeiro-de-Oliveira A, Botion L.M., Guerra RM, Foscolo RB, Machado LJ, Marubayashi U, et al. Acute Metabolic Effects of Thiopental Anesthesia on Fed and Fasted Rats Chronically Treated With Bromocriptine. *J Pharmacol Sci* 2003;92:149-51.
- (23) Machado LJ, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Effect of [1-Sar,8-Thr]-angiotensin II on the hyperglycemic response to hemorrhage in adrenalectomized and guanethidine-treated rats. *Regul Pept* 1995 Dec 7;60(1):69-77.
- (24) Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 2009 Jul;33(7):1089-98.
- (25) Foscolo DR, Foscolo RB, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Neonatal maternal separation affects endocrine and metabolic stress responses to ether exposure but not to restraint exposure in adult rats. *Metab Brain Dis* 2008 Dec;23(4):375-85.

- (26) Ribeiro-de-Oliveira A, Guerra RM, Foscolo RB, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Bromocriptine-induced dissociation of hyperglycemia and prolactin response to restraint. *Pharmacol Biochem Behav* 2001 Feb;68(2):229-33.
- (27) Rabasa C, Delgado-Morales R, Munoz-Abellan C, Nadal R, Armario A. Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behav Brain Res* 2011 Feb 2;217(1):232-9.
- (28) Zardooz H, Zahedi AS, Gharib Naseri MK, Hedayati M. Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiol Behav* 2006 Oct 30;89(3):373-8.
- (29) Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S, Takamura Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology* 1993 May;132(5):2199-205.
- (30) Kvetnansky R, Armando I, Weise VK, Holmes C, Fukuhara K, Deka-Starosta A, et al. Plasma dopa responses during stress: dependence on sympathoneural activity and tyrosine hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1992 Jun;261(3):899-909.
- (31) Smythe GA, Grusntein HS, Bradshaw JE, Nicholson MV, Compton PJ. Relationships between brain noradrenergic activity and blood glucose. *Nature* 1984;308(1):65-7.
- (32) Pacak K, Armando I, Fukuhara K, Kvetnansky R, Palkovits M, Kopin IJ, et al. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 1992 Aug 28;589(1):91-6.
- (33) Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Fukuhara K, Armando I, Kopin IJ, et al. Effects of single or repeated immobilization on release of norepinephrine and its metabolites in the central nucleus of the amygdala in conscious rats. *Neuroendocrinol* 1993 Apr;57(4):626-33.
- (34) Hernandez J, Segarra AB, Ramirez M, Banegas I, de GM, Alba F, et al. Stress influences brain enkephalinase, oxytocinase and angiotensinase activities: a new hypothesis. *Neuropsychobiology* 2009;59(3):184-9.
- (35) Chaouloff F, Laude D, Merino D, Serrurier B, Elghozi JL. Peripheral and central consequences of immobilization stress in genetically obese Zucker rats. *Am J Physiol* 1989 Feb;256(2 Pt 2):R435-R442.
- (36) Gomez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, et al. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol* 1990 Oct;259(4 Pt 2):F660-F665.

- (37) Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Menard J, Schambelan M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J Clin Invest* 1989 Feb;83(2):679-87.
- (38) Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci* 2009;14:958-72.
- (39) Kunori Y, Muroga Y, Iidaka M, Mitsuhashi H, Kamimura T, Fukamizu A. Species differences in angiotensin II generation and degradation by mast cell chymases. *J Recept Signal Transduct Res* 2005;25(1):35-44.
- (40) Yamamoto D, Shiota N, Takai S, Ishida T, Okunishi H, Miyazaki M. Three-dimensional molecular modeling explains why catalytic function for angiotensin-I is different between human and rat chymases. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jan 6;242(1):158-63.
- (41) Dendorfer A, Raasch W, Tempel K, Dominiak P. Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. *Basic Res Cardiol* 1998;93 Suppl 2:24-9.
- (42) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000 Sep 1;87(5):E1-E9.
- (43) Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000 Oct 27;275(43):33238-43.
- (44) Bindom SM, Lazartigues E. The sweeter side of ACE2: Physiological evidence for a role in diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;302:193-202.
- (45) Santos RA, Simoes E Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Jul 8;100(14):8258-63.
- (46) Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 1994 Apr;27(4):1033-47.
- (47) Zhu Z, Zhong J, Zhu S, Liu D, Van Der Giet M, Tepel M. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002 Nov;40(5):693-700.
- (48) Clark MA, Tallant EA, Tommasi E, Bosch S, Diz DI. Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase-dependent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003 Feb;41(2):276-83.

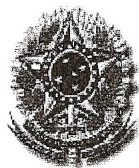
- (49) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000 Sep 1;87(5):E1-E9.
- (50) Yang G, Wan Z, Zhu Y. Angio II an important stress hormone . *Biological Signals* 1996;5:1-8.
- (51) Covenas R, Fuxe K, Cintra A, Aguirre JA, Goldstein M, Ganten D. Evidence for the existence of angiotensin II like immunoreactivity in subpopulations of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the A1 and C1 area of the ventral medulla of the male rat . *Neurosci Lett* 1990;114(2):160-6.
- (52) Plotsky PM, Sutton SW, Bruhn TO, Ferguson AV. Analysis of the Role of Angiotensin II in Mediation of Adrenocorticotropin Secretion. *Endocrinology* 1988;122:538-45.
- (53) Leong DS, Terron JA, Falcon-Neri A, Armando I, Ito T, Jöhren O, et al. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. *Neuroendocrinol* 2002 Apr;75(4):227-40.
- (54) Yamaguchi N, Ogawa S, Okada S. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase in the presympathetic neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus are involved in restraint stress-induced sympathetic activation in rats. *Endocrinology* 1993;132(5):2199-205.
- (55) Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006 Jul;86(3):747-803.
- (56) Leung PS, Chan WP, Wong TP, Sernia C. Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. *J Endocrinol* 1999;160:13-9.
- (57) Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol (Lond)* 2007 Apr 1;580(Pt 1):31-7.
- (58) Coimbra CC, Garofalo MA, Foscolo DR, Xavier AR, Migliorini RH. Gluconeogenesis activation after intravenous angiotensin II in freely moving rats. *Peptides* 1999;20(7):823-7.
- (59) Machado LJ, Mihessen-Neto I, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Hyperglycemic action of angiotensin II in freely moving rats. *Peptides* 1995;16(3):479-83.
- (60) Neto M, Reis AM, Marubayashi U, Coimbra CC. Effect of sympathoadrenal blockade on the hyperglycemic action of angiotensin II. *Neuropeptides* 1996;30(3):303-8.

- (61) Machado LJ , Marubayashi U., Reis AM, Coimbra CC. The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:1349-52.
- (62) Uresin Y, Erbas B, Ozek M. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose levels induced by chronic stress. *Pol J Pharmacol* 2004 Mar;56(2):271-3.
- (63) Saavedra JM, Benicky J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress* 2007 Jun;10(2):185-93.
- (64) Yuan L, Li X, Xu GL, Qi CJ. Effects of renin-angiotensin system blockade on islet function in diabetic rats. *J Endocrinol Invest* 2010 Jan;33(1):13-9.
- (65) Pscherer S, Heemann U, Frank H. Effect of Renin-Angiotensin system blockade on insulin resistance and inflammatory parameters in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2010 Apr;33(4):914-9.
- (66) Sjostrand M, Eriksson JW. Neuroendocrine mechanisms in insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:104-11.
- (67) Leung PS. Mechanisms of protective effects induced by blockade of the renin-angiotensin system: novel role of the pancreatic islet angiotensin-generating system in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2007 Feb;24(2):110-6.
- (68) Ribeiro-Oliveira A, Jr., Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, dos Santos RA, Simoes E Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(4):787-803.
- (69) Britto RR, Santos RA, Fagundes-Moura CR, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 1997 Sep;30(3 Pt 2):549-56.
- (70) Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* 1974 Mar;36(3):391-2.
- (71) Lee HB, Blafox MD. Blood volume in the rat. *J Nucl Med* 1985 Jan;26(1):72-6.
- (72) Thorens B. Central control of glucose homeostasis: the brain - endocrine pancreas axis. *Diabetes Metab* 2010;36:S45-S49.
- (73) Carlsson PO, Berne C, Jansson L. Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats. *Diabetologia* 1998 Feb;41(2):127-33.
- (74) Wang JM, Baudhuin P, Courtoy PJ, Potter W. Conversion of angiotensin II into active fragments by an endosomal pathway in bovine adrenal medullary cells in primary culture. *Endocrinology* 1995 Dec;136(12):5274-82.

- (75) Talas ZS, Yurekli M. The effects of enalapril maleate and cold stress exposure on tyrosine hydroxylase activity in some rat tissues. *Cell Biochem Funct* 2006;24:537-40.
- (76) Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 2001 May 11;276(19):16587-91.
- (77) Beard KM, Lu H, Ho K, Fantus IG. Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes* 2006 Oct;55(10):2678-87.
- (78) Etgen GJ, Fryburg DA, Gibbs EM. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes* 1997 Nov;46(11):1915-9.
- (79) Masori M, Hamamoto A, Mawatari K, Harada N, Takahasi A, Nakaya Y. Angiotensin II decreases glucose uptake by downregulation of GLUT1 in the cell membrane of the vascular smooth muscle cell line A10. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007 Sep;50(3):267-73.
- (80) Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* 2004 Feb;47(2):240-8.
- (81) Lupi R, Del GS, Bugliani M, Boggi U, Mosca F, Torri S, et al. The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets. *Eur J Endocrinol* 2006 Feb;154(2):355-61.
- (82) Kampf C, Lau T, Olsson R, Leung PS, Carlsson PO. Angiotensin II type 1 receptor inhibition markedly improves the blood perfusion, oxygen tension and first phase of glucose-stimulated insulin secretion in revascularised syngeneic mouse islet grafts. *Diabetologia* 2005 Jun;48(6):1159-67.
- (83) Ribeiro-Oliveira A, Jr., Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, dos Santos RA, Simoes E Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(4):787-803.
- (84) Sowers JR, Raij L, Jialal I, Egan BM, Ofili EO, Samuel R, et al. Angiotensin receptor blocker/diuretic combination preserves insulin responses in obese hypertensives. *J Hypertens* 2010 Aug;28(8):1761-9.
- (85) Lardizabal JA, Deedwania PC. The role of renin-angiotensin agents in altering the natural history of type 2 diabetes mellitus. *Curr Cardiol Rep* 2010 Nov;12(6):464-71.

- (86) Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* 2003 Jun;35(6):807-25.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **006/04** relativo ao projeto intitulado "*Avaliação da participação do sistema renina angiotensina na resposta a diferentes modalidades de estresse*" que tem como responsável Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **06.10.2004**.

Este certificado expira-se em **06.10.2009**

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **006/04** related to the project entitled "*Evaluation of the role of the renin-angiotensin system in the responses induced by different stressors*", under the supervision Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **06.10.2004**.

This certificate expires in **06.10.2009**.

Belo Horizonte, 06 de outubro de 2004

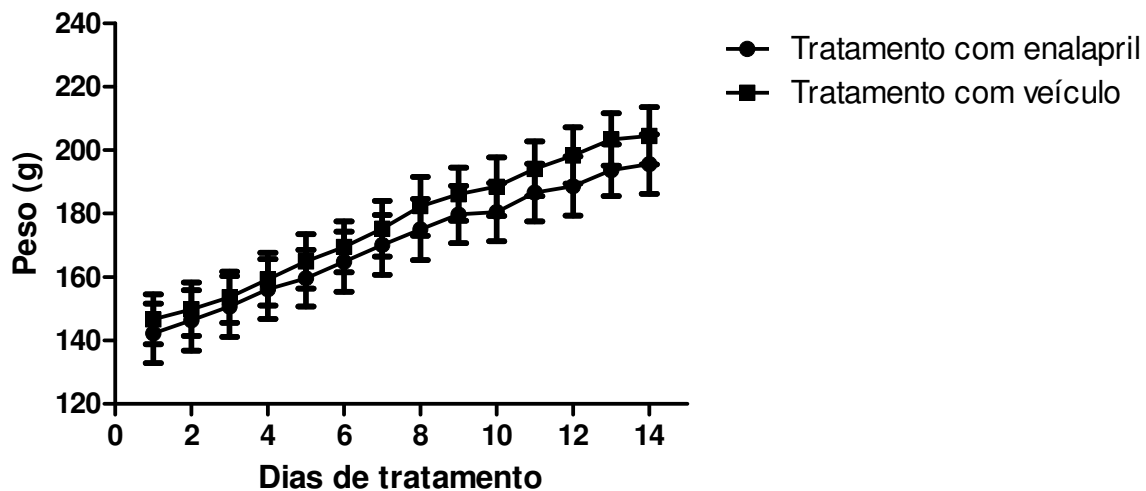
**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**

Presidente do CETEA/UFMG

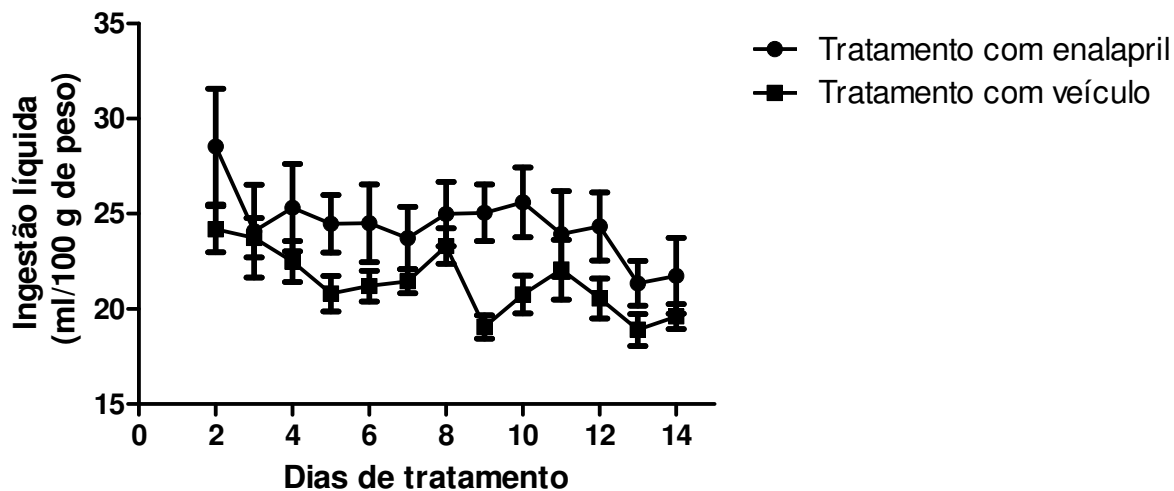
Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil  
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)



## APÊNDICE I



Apêndice IA: Peso durante o tratamento com enalapril ou veículo. Não há diferença estatística quando comparados os dois grupos ( $P > 0,05$ ).



Apêndice IB: Ingestão de solução com enalapril ou veículo durante o tratamento. Não há diferença estatística quando comparados os dois grupos ( $P > 0,05$ ).

## **Angiotensin converting enzyme inhibition and insulin secretion in acute restraint.**

<sup>1</sup>Júnia Ribeiro de Oliveira Longo Schweizer, <sup>1</sup>Paulo Augusto Carvalho de Miranda, <sup>1</sup>Rodrigo Bastos Fóscolo, <sup>1</sup>Joao Paulo Machado Lemos, <sup>1</sup>Luciano Fagundes de Paula, <sup>1</sup>Warley Cezar da Silveira, <sup>3</sup>Robson Augusto Souza dos Santos, <sup>2</sup>Sérgio Veloso Brant Pinheiro, <sup>3</sup>Candido Celso Coimbra, <sup>1</sup>Antônio Ribeiro-Oliveira Jr.

<sup>1</sup>Laboratory of Endocrinology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

<sup>3</sup>Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, MG, 31270-901, Brazil.

E-mails: juniarol@gmail.com; pauloacmiranda@terra.com.br; rbfoscolo@gmail.com;  
lucianodepaula@hotmail.com; warleycezar@yahoo.com.br; robsonsant@gmail.com;  
svbpinheiro@gmail.com; coimbrac@icb.ufmg.br; brolivei@uol.com.br.

### **Corresponding author:**

Antônio Ribeiro de Oliveira Jr

Rua São Romão 343/701, Santo Antônio

Belo Horizonte/Minas Gerais/Brasil

e-mail: **brolivei@uol.com.br**; **antoniorojr@gmail.com**

**Running title:** Chronic enalapril and restraint stress

**ABSTRACT**

There is increasing evidence of renin-angiotensin system (RAS) involvement in carbohydrate metabolism and its response modulation to stress. Restraint is a straightforward stress model that, although painless, powerfully activates the limbic system, besides activating hypothalamic stress regulator nucleus. This study aimed to evaluate the effects of chronic inhibition of RAS with enalapril upon glucose and insulin levels during acute restraint stress. Male Holtzman rats were treated with enalapril solution or vehicle for 14 days. A silastic catheter was adapted to an atrium catheter. After 1h adaptation, the basal sample was collected and the rats were then submitted to restraint stress. Samples were then drawn at 5, 10, 20 and 30min. The experimental groups were divided into: enalapril+ restraint (ER), vehicle+restraint (VR) and enalapril+saline (ES). After restraint, there was a hyperglycemic response already at 5min in ER and at 10min in VR, with peak at 20 and 10min, respectively ( $P < 0.05$ ). In ES, glucose levels did not vary significantly during restraint ( $P > 0.05$ ). No significant differences were observed when comparing ER, VR and ES areas under glucose curves ( $P > 0.05$ ). Restraint induced an important increase in insulin secretion in ER, contrasting with a mild elevation in VR, both with a peak at 20min ( $P < 0.05$ ). In ES, insulin secretion did not vary significantly ( $P > 0.05$ ). Our data reinforce the response modulation of RAS inhibition to stress and shows, for the first time, that RAS inhibition with enalapril augments the glucose-induced insulin secretion in a mild hyperglycemic stress such as in acute restraint.

**Keywords:** Stress, restraint, immobilization, angiotensin, ACE inhibitors, enalapril.

## 1.1 INTRODUCTION

There is an increasing evidence of the importance of renin-angiotensin system (RAS) in metabolic regulation. Previous studies have demonstrated its modulation in response to both acute and chronic stress [1-8]. Furthermore, there are evidences of the possible effects of the blockage of RAS in carbohydrate metabolism [9-15].

Restraint stress has been currently used as a straightforward, painless stress model. [10, 16]. It usually helps understanding the human social and psychological stress permeating our society. Restraint activates hypothalamic nucleus resulting in autonomic discharge of noradrenaline and adrenaline, resulting in mild hyperglycemia, with maximal observed responses seen in the first 30 minutes of this stress. [10, 17, 18]. We have recently shown that angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition can modify glucose-induced insulin secretion in rats submitted to acute neuroglucopenia[19]. We thus hypothesized that ACE inhibition could possibly stimulate glucose-induced insulin secretion in stress involving different pathways such as restraint. [17, 20, 21].

This study aimed to evaluate the effects of the chronic inhibition of RAS with enalapril upon glucose and insulin levels in acute restraint stress.

## 1.2 METHODS

### 1.2.1 Animals

Male Holtzman rats of 7-9 weeks of age provided from Federal University of Minas Gerais Medical School Central Animal Facility were maintained under temperature-controlled conditions with an artificial 12-hour light-dark cycle, and allowed standard chow and water *ad libitum*. All procedures, including rat anesthesia and euthanasia were performed as recommended and approved by the University Ethics Committee for Animal Experiments (protocol number 006/04). [22]

### 1.2.2 Experimental design

Rats were placed in individual cages and treated with enalapril maleate (Merck, São Paulo, Brazil) in drinking water (5% solution, 10mg/kg/day) for two weeks or no addition (vehicle) for the same period, according to a well established protocol [23]. The same protocol of enalapril administration had been previously used, showing an effective blockade of ACE [23] and no effects on body weight and drinking adherence [19].

Two days before the experiments, rats on chronic enalapril treatment for two weeks and controls were anesthetized, and a silastic catheter (0,5mm DI, 0,94mm DE, N°602-135, Dow Corning Corporation, Auburn, Michigan, USA) was inserted through the jugular vein into the right atrium for blood sampling and drug administration [24]. One hour before restraint, the enalapril-treated animals received a single intra-venous dose of 5mg/kg enalapril maleate diluted in NaCl 0.9% (5% solution) [23], whereas control rats were given a single dose of NaCl 0.9%. This last dose was administered to assure high circulating enalapril concentrations during the experiments. Then, the animals were returned to their home cages and allowed to rest for 60

minutes. At the end of the rest period, baseline samples were collected via the atrium catheter immediately before the induction of restraint stress or vehicle infusion, and further 0.5 ml blood samples were collected at 5, 10, 20 and 30 min following the infusions. Plasma volume was restored by saline injection after each blood collection. The experiments were all carried out between 8:00am and 12:00pm in a quiet equipped experimental room for accomplishment of stress experiments under temperature control. The restraint stress was made by a PVC cylinder (21 cm length and 4.5 cm diameter) which could produce discomfort without apparent pain. The animals were divided into 3 experimental groups: enalapril-treated rats subjected to restraint stress (ER), control rats submitted to restraint stress (VR), and enalapril-treated rats receiving NaCl 0.9% infusion without restraint stress (ES).

### 1.2.3 Assays

All metabolic and hormone parameters were assayed in duplicate. Glucose was assayed by glucose oxidize method (GOD-ANA, CENTERLAB, Santa Luzia, Minas Gerais, Brazil). Insulin was measured by radioimmunoassay (SRI-13K, Linco Research, St. Charles, Missouri, USA), using rat insulin I<sup>125</sup>-labeled and rat anti insulin serum as the antibody of the assay. All insulin measurements were assayed in a single assay to avoid inter-assay variation. Our average intra-assay variation was 5%.

### 1.2.4 Statistical analysis

The statistical program Prisma (GraphPad 5, La Jolla, CA, USA) was used. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The samples obtained before and after restraint stress were compared by Student's paired *t*-test. The differences among groups during restraint stress were determined by two-way ANOVA and confirmed by Bonferroni's post test. The areas under glucose and insulin curves were compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post test. Values of  $P < 0.05$  were taken as significant.

## 1.3 RESULTS

### 1.3.1 Effects of restraint stress on plasma glucose levels

As illustrated in figure 1A and 1B, the baseline plasma glucose levels were not significantly different among groups ( $P > 0.05$  for all comparisons). Restraint induced an increase in plasma glucose levels, already significant at 5min in enalapril-treated stressed rats (ER) ( $96.5 \pm 3.4$  mg/dl,  $P < 0.01$ ), reaching a peak at 20min in (ER) group ( $117.4 \pm 11.96$  mg/dl,  $P < 0.05$ ). In vehicle- stressed rats (VR), plasma glucose levels peaked at 10min ( $113.6 \pm 12.9$  mg/dl,  $P < 0.05$ ), and maintained elevated throughout the experiment. These data show that restraint induces an early hyperglycemic response that maintained throughout the experiments. Plasma glucose levels in enalapril-treated non-stressed rats (ES) did not vary significantly during restraint ( $P > 0.05$  for all comparisons).

### 1.3.2 Effects of restraint stress on plasma insulin levels

The baseline plasma insulin levels did not differ significantly among groups (Figure 2A). During restraint, there was an important and progressive increase in insulin secretion in ER, reaching a peak at 20min ( $1.89 \pm 0.51$  ng/ml;  $P < 0.05$ ). Thereafter, insulin levels decreased, tending to return to baseline values levels at 30min. In VR, it was observed a flat insulin curve although a peak could also be observed at 20min ( $1.17 \pm 0.38$  ng/ml;  $P < 0.05$ ). After this peak, insulin levels tended to return to its baseline values. Saline infusion did not change significantly plasma insulin levels in ES during the whole experiment.



The analysis of the areas under the plasma insulin curves confirmed significant differences among groups (figure 2B), showing higher insulin levels in ER when compared to VR and ES ( $P < 0.01$  for both comparisons). Moreover, the areas under plasma insulin curves were not significantly different when comparing VR and ES ( $P > 0.05$ ). These data show a strong glucose-induced insulin secretion in ER, while the mild stress hyperglycemia observed in restraint could not modify the whole response in VR as compared to non-stressed controls (ES).

#### 1.4 DISCUSSION:

The involvement of RAS in metabolic regulation has been of great interest as the RAS inhibitors have shown potential benefits in carbohydrate disturbances [25-28]. However, the RAS participation in metabolism is not fully understood and few studies have evaluated the RAS modulation of acute response to stress [13, 14, 19]. In this regard, we have recently published on the importance of RAS modulation following a neuroglucopenic challenge [19]. Our present data shows that chronic RAS inhibition with enalapril also modifies the glucose-induced insulin secretion in restraint while it did not change baseline glucose and insulin levels. These data show that enalapril may stimulate glucose-induced insulin secretion in acute restraint as well as previously demonstrated in neuroglucopenia [19].

Neuroendocrine responses to stressors are usually seen as compensatory mechanisms to maintain homeostasis [17, 29]. This study has utilized the acute restraint model, representing the psychosocial stress usually observed in daily life [10], as it powerfully activates several areas of the limbic system [17]. However, different metabolic pathways are elicited when compared to other specific stress models [4, 30-34]. Specifically, restraint typically activates the paraventricular nucleus, medial preoptic nucleus and the lateral hypothalamic area which are all known to be involved in metabolic stress regulation [4, 17, 33-35]. In contrast to metabolic stressors such as hypoglycemia, restraint elicits a mild hyperglycemic response [17, 34, 36, 37] coupled to a small increase in insulin secretion [17, 36]. This hyperglycemic response to restraint is mainly due to discharge of catecholamines, although glucagon and autonomic output to the liver are also supposed to play a role [4, 37, 38]. Indeed, our controls submitted to stress of restraint showed a mild but significant hyperglycemic response to acute restraint which did not differ from enalapril-treated stressed animals, although a delay of 5 minutes to reach a significant

hyperglycemic response was observed in the latter as compared to the former. However, these hyperglycemic stress responses observed during the whole stress experiments were mild enough to reach statistical significance when compared to non-stressed controls by the analysis of the areas under glucose curves. Likewise, our controls submitted to restraint showed a mild insulin secretion that reached significant difference only at 20min restraint and, consequently, no statistical difference could be detected when areas under insulin curves were compared between stressed and non-stressed controls.

On the other hand, despite a quite similar, albeit earlier hyperglycemic response observed in enalapril-treated stressed animals when compared to stressed controls, this group of animals showed a stronger insulin secretion. This result was also confirmed by the analysis of the areas under the insulin curves when enalapril-treated stressed animals showed higher insulin secretion when compared to controls. These data show that chronic RAS inhibition with enalapril augments the glucose-induced insulin secretion during 30min acute restraint.

Different mechanisms or a combination of them could possibly explain these enalapril-induced changes in glucose metabolism during restraint. Studies have suggested that enalapril prevents the increase of tyrosine hydroxylase activity in the adrenal medulla of rats exposed to cold stress [39], and it could thus have attenuated the noradrenaline-mediated inhibition of insulin release in enalapril-treated rats submitted to restraint. Alternative mechanisms are also supposed to be involved in this regulation, especially those related to the primary effects of RAS inhibitors reducing angiotensin II levels and increasing both bradykinin and angiotensin-(1-7) levels [26, 27, 40-44]. Indeed, the net results of alterations in these peptide levels could possibly have improved the blood flow to pancreatic islet and interfered in calcium influx, ultimately leading to increased glucose-induced insulin secretion [2, 20, 28, 45-47]. In agreement to this

hypothesis is the presence of RAS molecules in islets where their expression has been shown to be sensitive to glucose concentration [46, 48]. Furthermore, a recent study has demonstrated the pancreatic human islets protection from glucotoxicity by treatment with ACE inhibitors [46].

This study shows for the first time the influence of chronic treatment with enalapril upon carbohydrate metabolism in rats acutely exposed to restraint. It is noteworthy that these changes here shown are somewhat related to what could happen either in states of sudden anxiety in humans or during an unpredictable psychosocial stress event. Interestingly, similar changes in glucose-induced insulin secretion has been recently reported by our group during neuroglucopenic stress [19], a metabolic challenge that evokes a strong hyperglycemic response [34]. These data suggest that enalapril-induced changes in carbohydrate metabolism during stress are operating in stress models that differentially impact the autonomic discharge of catecholamines.

It is well-known that RAS inhibitors are the mainstay in the treatment of hypertensive diabetes population besides its established indications for normotensive patients [45, 49]. Indeed, the latest discovers in this field has shown that the beneficial effects of RAS inhibition are beyond the blood pressure control [45, 50, 51]. Importantly, the burgeoning worldwide diabetes epidemic is expected to increase even more the prescription of RAS inhibitors. One possible implication of our findings is that RAS inhibition could possibly change the neuroendocrine response in acute psychosocial stresses observed in daily life by exacerbating the insulin secretion following this stress hyperglycemia. Therefore, further studies targeting RAS modulation in metabolism are necessary to better address the role of RAS inhibition in pancreatic islets during stress procedures in order to guide novel therapeutic interventions to this promising field.

**CONCLUSION:**

We show for the first time that RAS inhibition with enalapril augments the glucose-induced insulin secretion in a mild hyperglycemic stress such as acute restraint.

## Reference List

1. Machado, L. J.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. Evidence of angiotensin II involvement in prolactin secretion in response to hemorrhage in adrenalectomized and guanethidine-treated rats. *Eur. J. Endocrinol.* 2002, 146:439-446.
2. P.S.Leung. Mechanisms of protective effects induced by blockade of the renin-angiotensin system: novel role of the pancreatic islet angiotensin-generating system in Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 2007, 24:110-116.
3. Yang G; Wan Y; Zhu Y. Angiotensin II - an important stress hormone. *Biological Signals* 1996, 5:1-8.
4. Pacak, K. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res.* 2000, 49 Suppl 1:S11-S17.
5. Zardooz, H.; Zahedi, A. S.; Gharib Naseri, M. K.; Hedayati, M. Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiol Behav.* 2006, 89:373-378.
6. Nobuharu Yamaguchi. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992, 70:167-206.
7. Rabasa, C.; Munoz-Abellan, C.; Daviu, N.; Nadal, R.; Armario, A. Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiol Behav.* 2011.
8. Antoni, F. A.; Kenyon, C. J. Deja vu: angiotensin and stress. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003, 14:249-250.
9. Pscherer, S.; Heemann, U.; Frank, H. Effect of Renin-Angiotensin system blockade on insulin resistance and inflammatory parameters in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2010, 33:914-919.
10. Buynitsky, T.; Mostofsky, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2009, 33:1089-1098.
11. Coimbra, C. C.; Garofalo, M. A.; Foscolo, D. R.; Xavier, A. R.; Migliorini, R. H. Gluconeogenesis activation after intravenous angiotensin II in freely moving rats. *Peptides* 1999, 20:823-827.
12. Neto, M.; Reis, A. M.; Marubayashi, U.; Coimbra, C. C. Effect of sympathoadrenal blockade on the hyperglycemic action of angiotensin II. *Neuropeptides* 1996, 30:303-308.
13. Machado, L. J.; Marubayashi, U.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. Effect of [1-Sar,8-Thr]-angiotensin II on the hyperglycemic response to hemorrhage in adrenalectomized and guanethidine-treated rats. *Regul. Pept.* 1995, 60:69-77.

14. Machado, L. J.; Mihessen-Neto, I.; Marubayashi, U.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. Hyperglycemic action of angiotensin II in freely moving rats. *Peptides* 1995, 16:479-483.
15. Machado LJ ; Marubayashi U.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. *Braz. J Med Biol Res* 1998, 31:1349-1352.
16. Rabasa, C.; Delgado-Morales, R.; Munoz-Abellan, C.; Nadal, R.; Armario, A. Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behav. Brain Res.* 2011, 217:232-239.
17. Pacak, K.; Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Rev.* 2001, 22:502-548.
18. Chaouloff, F.; Laude, D.; Merino, D.; Serrurier, B.; Elghozi, J. L. Peripheral and central consequences of immobilization stress in genetically obese Zucker rats. *Am. J. Physiol* 1989, 256:R435-R442.
19. Miranda, P. A.; Simoes E Silva AC; Longo, J. R.; Madureira, M. M.; Foscolo, R. B.; Machado, L. J.; Boas, W. W.; dos Santos, R. A.; Coimbra, C. C.; Ribeiro-Oliveira, A., Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibition changes the metabolic response to neuroglucopenic stress. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 2011.
20. Lau, T.; Carlsson, P. O.; Leung, P. S. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* 2004, 47:240-248.
21. Dendorfer, A.; Raasch, W.; Tempel, K.; Dominiak, P. Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. *Basic Res. Cardiol.* 1998, 93 Suppl 2:24-29.
22. CETEA - UFMG - <http://www.ufmg.br/bioetica/cetea>  
Links:[http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com\\_content&task=view&id=22&Itemid=35](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com_content&task=view&id=22&Itemid=35)and[http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com\\_content&task=view&id=19&Itemid=41](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com_content&task=view&id=19&Itemid=41). In: 2008.
23. Britto, R. R.; Santos, R. A.; Fagundes-Moura, C. R.; Khosla, M. C.; Campagnole-Santos, M. J. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 1997, 30:549-556.
24. Harms, P. G.; Ojeda, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Appl. Physiol* 1974, 36:391-392.
25. Lindholm, L. H.; Ibsen, H.; Dahlof, B.; Devereux, R. B.; Beevers, G.; de, F. U.; Fyhrquist, F.; Julius, S.; Kjeldsen, S. E.; Kristiansson, K.; Lederballe-Pedersen, O.; Nieminen, M. S.; Omvik, P.; Oparil, S.; Wedel, H.; Aurup, P.; Edelman, J.; Snapinn, S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002, 359:1004-1010.

26. Beril Tom; Andreas Dendorfer; AH Jan Danser. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2003, 35:792-801.
27. Carlsson, P. O.; Berne, C.; Jansson, L. Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats. *Diabetologia* 1998, 41:127-133.
28. Kampf, C.; Lau, T.; Olsson, R.; Leung, P. S.; Carlsson, P. O. Angiotensin II type 1 receptor inhibition markedly improves the blood perfusion, oxygen tension and first phase of glucose-stimulated insulin secretion in revascularised syngeneic mouse islet grafts. *Diabetologia* 2005, 48:1159-1167.
29. JP Henry. *Biological Basis of the Stress Response*. *News in Physiological Sciences* 1993, 8:69-73.
30. Maria Konarska; Robert E. Stewart; Richard McCarty. Sensitization of sympathetic-adrenal medullary responses to a novel stressor in chronically stressed laboratory rats. *Physiology & Behavior* 1989, 46:129-135.
31. Dronjak, S.; Jezova, D.; Kvetnansky, R. Different effects of novel stressors on sympathoadrenal system activation in rats exposed to long-term immobilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1018:113-123.
32. Dronjak, S.; Gavrilovic, L.; Filipovic, D.; Radojic, M. B. Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol Behav.* 2004, 81:409-415.
33. Ribeiro-de-Oliveira, A.; Guerra, R. M.; Foscolo, R. B.; Marubayashi, U.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. Bromocriptine-induced dissociation of hyperglycemia and prolactin response to restraint. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001, 68:229-233.
34. Ribeiro-de-Oliveira, A., Jr.; Guerra, R. M.; Foscolo, R. B.; Marubayashi, U.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. Effects of chronic bromocriptine (CB-154) treatment on the plasma glucose and insulin secretion response to neurocytopenia in rats. *J. Endocrinol.* 1999, 162:237-242.
35. Busnardo, C.; Tavares, R. F.; Resstel, L. B.; Elias, L. L.; Correa, F. M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton. Neurosci.* 2010, 158:51-57.
36. Ricart-Jane, D.; Rodriguez-Sureda, V.; Benavides, A.; Peinado-Onsurbe, J.; Lopez-Tejero, M. D.; Llobera, M. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 2002, 51:925-931.
37. Foscolo, D. R.; Foscolo, R. B.; Marubayashi, U.; Reis, A. M.; Coimbra, C. C. Neonatal maternal separation affects endocrine and metabolic stress responses to ether exposure but not to restraint exposure in adult rats. *Metab Brain Dis.* 2008, 23:375-385.



38. Yamada, F.; Inoue, S.; Saitoh, T.; Tanaka, K.; Satoh, S.; Takamura, Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology* 1993, 132:2199-2205.
39. Zeliha Selamoglu Talas; Muhittin Yurekli. The effects of enalapril maleate and cold stress exposure on tyrosine hydroxylase activity in some rat tissues. *cell biochemistry and function* 2006, 24:537-540.
40. Henriksen, E. J.; Jacob, S.; Kinnick, T. R.; Youngblood, E. B.; Schmit, M. B.; Dietze, G. J. ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *Am. J. Physiol* 1999, 277:R332-R336.
41. Uresin, Y.; Erbas, B.; Ozek, M.; Ozkok, E.; Gurol, A. O. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 2004, 5:93-96.
42. Uresin, Y.; Erbas, B.; Ozek, M. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose levels induced by chronic stress. *Pol. J. Pharmacol.* 2004, 56:271-273.
43. Beard, K. M.; Lu, H.; Ho, K.; Fantus, I. G. Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes* 2006, 55:2678-2687.
44. Mikaela Sjostrand; Jan W Eriksson. Neuroendocrine mechanisms in insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009, 297:104-111.
45. Sowers, J. R.; Raij, L.; Jialal, I.; Egan, B. M.; Ofili, E. O.; Samuel, R.; Zappe, D. H.; Purkayastha, D.; Deedwania, P. C. Angiotensin receptor blocker/diuretic combination preserves insulin responses in obese hypertensives. *J. Hypertens.* 2010, 28:1761-1769.
46. Lupi, R.; Del, G. S.; Bugliani, M.; Boggi, U.; Mosca, F.; Torri, S.; Del, P. S.; Marchetti, P. The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets. *Eur. J. Endocrinol.* 2006, 154:355-361.
47. Anders Tengholm; Erik Gylfe. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009, 297:58-72.
48. Leung, P. S.; Chan W.P.; Wong T.P.; Sernia C. Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. *J. Endocrinol.* 1999, 160:13-19.
49. Ribeiro-Oliveira, A., Jr.; Nogueira, A. I.; Pereira, R. M.; Boas, W. W.; dos Santos, R. A.; Simoes E Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc. Health Risk Manag.* 2008, 4:787-803.
50. Lardizabal, J. A.; Deedwania, P. C. The role of renin-angiotensin agents in altering the natural history of type 2 diabetes mellitus. *Curr. Cardiol. Rep.* 2010, 12:464-471.
51. Engeli, S.; Schling, P.; Gorzelnia, K.; Boschmann, M.; Janke, J.; Ailhaud, G.; Teboul, M.; Massiera, F.; Sharma, A. M. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003, 35:807-825.

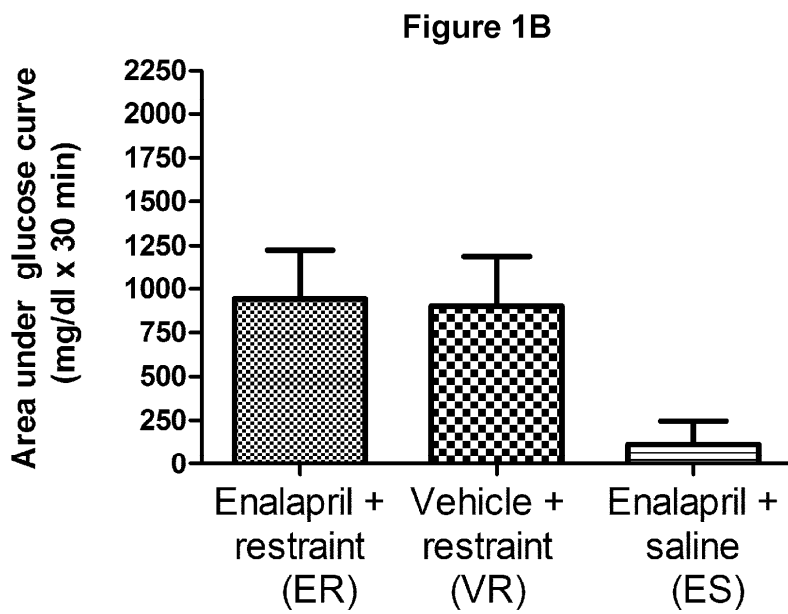
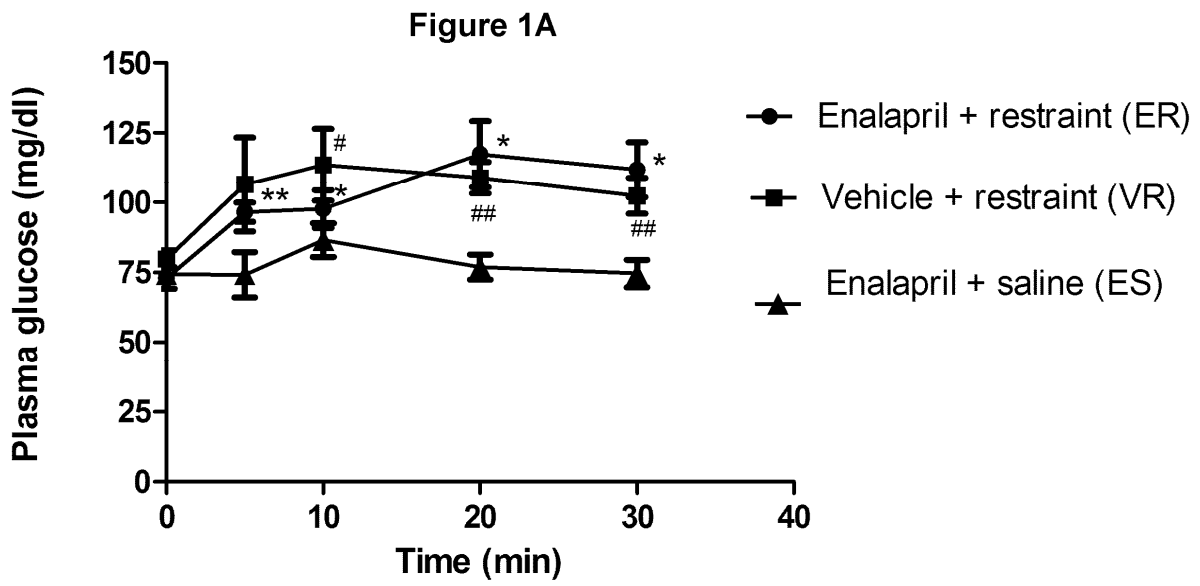
**FIGURE LEGENDS:**

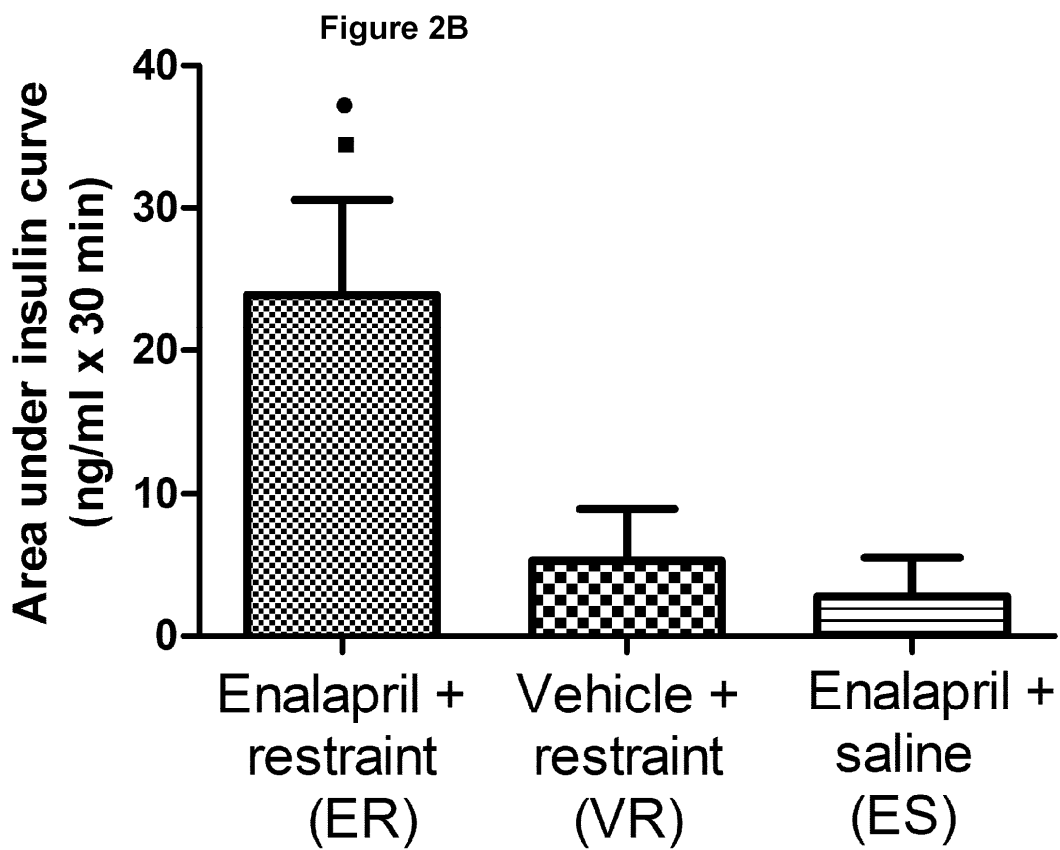
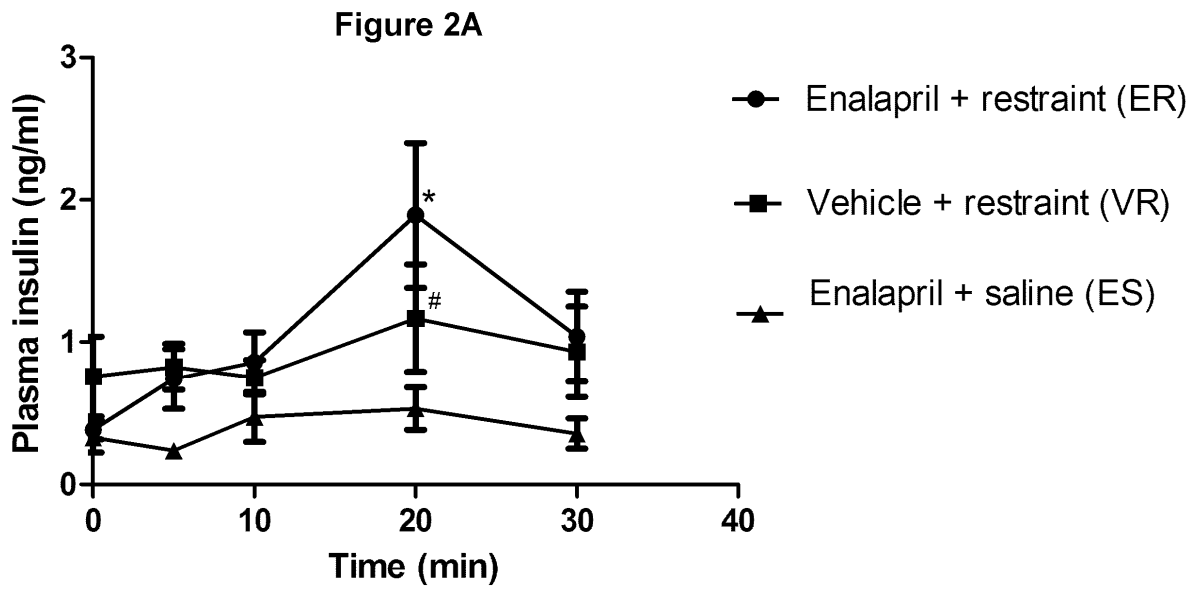
**Figure 1A.** Effects of restraint stress on plasma glucose levels (absolute values) in rats chronically treated with enalapril. The values are expressed as means  $\pm$  SEMs of the individual observations for each of the groups: ER (8 rats chronically treated with enalapril and submitted to restraint stress); VR (9 rats chronically treated with vehicle and submitted to restraint stress); ES (6 rats chronically treated with enalapril and submitted to saline infusion but not submitted to stress). \*  $P < 0.05$  for comparison to ER baseline level. \*\*  $P < 0.01$  for comparison to ER baseline level. #  $P < 0.05$  for comparison to VR baseline level. ##  $P < 0.01$  for comparison to VR baseline level.

**Figure 1B.** Graphic representation of the areas under plasma glucose curves. The values represent the means  $\pm$  SEMs of the individual areas. There were no significant differences among groups when comparing the areas under glucose curves

**Figure 2A.** Effects of restraint stress on plasma insulin levels (absolute values) in rats chronically treated with enalapril. The values represent the means  $\pm$  SEMs of the individual observations for each of the groups: ER (8 rats chronically treated with enalapril and submitted to restraint stress); VR (9 rats chronically treated with vehicle and submitted to restraint stress); ES (6 rats chronically treated with enalapril and submitted to saline infusion but not submitted to stress). \*  $P < 0.05$  for comparison to ER baseline value. #  $P < 0.05$  for comparison to VR baseline value.

**Figure 2B.** Graphic representation of the areas under plasma insulin curves. The values represent the means  $\pm$  SEM of the individual areas. ●  $P < 0.05$  for comparison between ER and VR; and ■  $P < 0.05$  for comparison between ER and ES.





## APÊNDICE III

**Angiotensin converting enzyme inhibition changes the metabolic response to neurogluopenic stress**

Paulo Augusto Carvalho Miranda<sup>1</sup>, Ana Cristina Simões e Silva<sup>2</sup>, Junia Ribeiro de Oliveira Longo<sup>1</sup>, Marcos Magalhães Madureira<sup>1</sup>, Rodrigo Bastos Fóscolo<sup>1</sup>, Lucas José Campos Machado<sup>1</sup>, Walkíria Wingester Vilas Boas<sup>1</sup>, Robson Augusto dos Santos<sup>3</sup>, Candido Celso Coimbra<sup>3</sup>, Antônio Ribeiro-Oliveira Jr<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

**Corresponding author:**

Antônio Ribeiro de Oliveira Jr

Rua São Romão 343/701, Santo Antônio

Belo Horizonte/Minas Gerais/Brasil

e-mail: [brolivei@uol.com.br](mailto:brolivei@uol.com.br); [antoniorojr@gmail.com](mailto:antoniorojr@gmail.com)

**Key words:** Stress, Neurogluopenia, Angiotensin, ACE inhibitors, 2-deoxy-D-glicose, 2DG, stress, Enalapril.

**Running title:** Chronic Enalapril and Neurogluopenia

## APÊNDICE III

### Abstract

**Introduction:** Neuroglucopenia induced by 2-deoxy-D-glucose (2DG) activates hypothalamic glucoreceptors leading to increased hepatic glucose production and insulin inhibition. This response is similar to what is observed with intra-venous (IV) injection of Angiotensin II (Ang II). However, the involvement of an angiotensin converting enzyme inhibitor on neuroglucopenia has not been investigated. The aim of this study was to determine the effects of the chronic enalapril treatment upon plasma glucose, insulin and lipid levels in response to neuroglucopenia. **Methods:** Male Holtzman rats (120-170g) were chronically treated with enalapril (10 mg/kg/day) in the drinking water for 2 weeks. In the day of experiment the animals received an IV enalapril final dose one hour before the neuroglucopenic stress by 2DG infusion (500 mg/kg), and blood samples were drawn before and 5, 10, 20, 30 and 60 minutes following infusion. **Results:** The hyperglycemic response to 2DG was not significantly changed by enalapril treatment. Enalapril-treated group exhibited a peak of plasma insulin higher than controls. Plasma triglyceride showed a significant increase only in enalapril group after neuroglucopenic stress ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** These data show that chronic enalapril treatment changes insulin and triglycerides response to neuroglucopenia, suggesting an effect upon glucose-induced insulin secretion and the storage of triglycerides.

**Key words:** Stress, Neuroglucopenia, Angiotensin, ACE inhibitors, Insulin, Enalapril.

## APÊNDICE III

### INTRODUCTION

The metabolic actions of the renin-angiotensin system (RAS) have been the target of several studies. Its participation in the metabolic response to stress was previously described for both acute and chronic forms of stress as a result of hemorrhage<sup>1</sup> and immobilization.<sup>2-4</sup> However, the data obtained so far refer to the direct blockade of angiotensin II receptors. Despite clinical studies demonstrating that inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE) has beneficial effects on carbohydrate metabolism<sup>5</sup>, little is known about the role of ACE inhibitors on acute stresses and their interactions with lipid metabolism.

2-deoxy-d-glucose (2DG) is a non-metabolizable analog of glucose that effectively blocks glucose utilization by neurons. Its peripheral infusion produces neuroglucopenia, which induces activation of hypothalamic glucoreceptors with a consequent rise in the sympathetic output to the liver, pancreas, adrenal medulla and adipose tissue, resulting in increased hepatic production of glucose, inhibition of insulin secretion and mobilization of free fatty acids from adipose tissue.<sup>6-8</sup>

The aim of this study was to investigate the effects of the chronic administration of enalapril, an ACE inhibitor, upon plasma glucose levels, insulin, triglycerides and cholesterol in rats submitted to acute neuroglucopenic stress by 2DG infusion. We expected a priori that ACE inhibition would stimulate the glucose-induced insulin secretion and possibly interfere with plasma triglycerides in response to neuroglucopenia. We have shown here that treatment with enalapril was able to change insulin and triglyceride responses to an acute neuroglucopenic challenge, confirming our initial hypothesis.

## APÊNDICE III

### MATERIAL AND METHODS

#### Animals

Male Holtzman rats (120 to 170g), provided from Federal University of Minas Gerais Medical School Central Animal Facility, were maintained under temperature-controlled conditions with an artificial 12-hour light-dark cycle, and allowed standard chow and water *ad libitum*. The University Ethics Committee for Animal Experiments approved all procedures.

#### Experimental design

##### *Protocol 1: Effect of long-term administration of enalapril on body weight and drinking adherence*

Rats were placed in individual cages and treated with enalapril maleate (Merck, São Paulo, Brazil) in drinking water (5% solution, 10mg/kg/day) for two weeks or no addition (vehicle) for the same period, according to a well established protocol.<sup>9</sup> The same protocol of enalapril administration was previously used by Britto et al., whose data have shown an effective blockade of ACE.<sup>9</sup> In order to address the role of the chronic enalapril treatment upon body weight and drinking adherence, daily liquid intake and body weights of enalapril-treated and control rats were recorded.

##### *Protocol 2: Effect of long term-administration of enalapril on metabolic response to neuroglucopenic stress by 2DG infusion*

Two days before the experiments, rats on chronic enalapril treatment for two weeks and controls were anesthetized, and a silastic catheter (0,5mm DI, 0,94mm DE,



### APÊNDICE III

N°602-135, Dow Corning Corporation, Michigan, Auburn, USA) was inserted through the jugular vein into the right atrium for blood sampling and drug administration.<sup>10</sup> One hour before the induction of neuroglucopenic stress, the enalapril-treated animals received a single intra-venous dose of 5mg/kg enalapril maleate diluted in NaCl 0.9% (5% solution),<sup>9</sup> whereas control rats were given a single dose of NaCl 0.9%. This last dose was administered to assure high circulating enalapril concentrations during the experiments. Then, the animals were returned to their home cages and allowed to rest for 60 min. At the end of the rest period, baseline samples were collected via the atrial catheter immediately before the induction of neuroglucopenic stress or vehicle infusion, and further 0.6 ml blood samples were collected at 5, 10, 20, 30 and 60 min following the infusions. Plasma volume was restored by saline injection after every blood collection.

The experiments were all carried out between 8:00AM and 12:00PM in a quiet equipped experimental room for accomplishment of stress experiments under temperature control. Neuroglucopenic stress was induced by infusion of 50mg/100g of 2-deoxy-D-glucose 10% solution.<sup>8</sup> The animals were divided into 3 experimental groups: control rats submitted to neuroglucopenic stress (VD), enalapril-treated rats subjected to neuroglucopenic stress (ED), and enalapril-treated rats receiving NaCl 0.9% infusion instead of 2DG solution (ES).

### Assays

All metabolic and hormone parameters were assayed in duplicate. Glucose was assayed by glucose oxidize method (GOD-ANA, CENTERLAB, Santa Luzia, Minas Gerais, Brazil), and lipids (triglycerides and cholesterol) were assayed by enzymatic

### **APÊNDICE III**

method (CENTERLAB, Santa Luzia, Minas Gerais, Brazil). Insulin was measured by radioimmunoassay (SRI-13K, Linco Research, St. Charles, Missouri, USA), using rat insulin I<sup>125</sup>-labeled and rat anti insulin serum as the antibody of the assay. All insulin measurements were assayed in a single assay to avoid inter-assay variation. Our average intra-assay variation was 5%.

#### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean±standard error of the mean (SEM). The samples obtained before and after neuroglucopenic stress were compared by Student's paired T-test. Differences between the groups were determined using ANOVA followed by the Holm Sidak test. The areas under glucose, insulin, triglyceride and cholesterol curves were integrated by the trapezium rule and compared by ANOVA followed by Student T-test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## APÊNDICE III

### RESULTS

#### **Effect of long-term administration of enalapril on body weight and drinking adherence**

Enalapril treatment did not change water intake volume or weight gain in the enalapril-treated animals when compared with control animals (Table 1). There was no difference between the 2-week fluid intake of animals who on the day of the neuroglucopenic stress were assigned to stress or to control groups, suggesting that they had equal exposure to enalapril.

#### **Effects of 2DG injection on plasma glucose levels of enalapril-treated rats**

There was a marked increase in plasma glucose levels for both groups (VD and ED) submitted to 2DG infusion, which was already significant at 5 min ( $p < 0.01$ ), and reached a peak at 30 min in CD group ( $306.5 \pm 22.8 \text{ mg/dl}$ ) and at 60 min in ED group ( $310.3 \pm 28.7 \text{ mg/dl}$ ). No significant changes were found between VD and ED groups during the 60 min stress protocol ( $p > 0.05$ , Figure 1A). Baseline plasma glucose levels were similar in enalapril-treated rats (groups ED and ES) when compared to VD group ( $p > 0.05$  for all comparisons).

The comparison between areas under glucose curves of stressed animals (ED and VD groups) did not show significant differences (Figure 1B).

#### **Effects of 2DG injection on plasma insulin levels of enalapril-treated rats**

### APÊNDICE III

As observed in figure 2, saline infusion did not change plasma insulin levels. However, 2DG infusion decreased plasma insulin levels in stressed control group (VD), reaching a small but significant reduction at 5 min after infusion ( $p < 0.05$ ) despite the huge increase of plasma glucose levels. Following this initial period, insulin levels of this group recovered to basal values after a brief trend toward an increase at 30 min. In sharp contrast, enalapril-treated rats submitted to neurocytopenic stress (ED group) did not decrease plasma insulin levels. This group, otherwise, exhibited a significant increase of insulin levels with a peak at 30 min ( $1.13 \pm 0.26 \text{ ng/ml}$ ), differing significantly at this time point from VD group ( $p < 0.05$ ). Enalapril-treated animals (ED and ES group) did not show significant differences in baseline plasma insulin levels when compared to controls ( $p > 0.05$ , for both comparisons).

The analysis of the areas under the plasma insulin curves reveal significant differences between groups, showing higher insulin levels in enalapril-treated stressed rats (ED group), whereas the control animals submitted to 2DG infusion did not significantly differ from ES group (Figure 2B).

#### **Effects of 2DG injection on plasma triglycerides of enalapril-treated rats**

After 2DG infusion, an accentuated and long-lasting rise in plasma triglyceride levels of ED group was observed, reaching a peak at 10 min ( $33.8 \pm 6.8 \text{ mg/dl}$ ,  $p < 0.05$  when compared to baseline levels). In contrast to ED group, plasma triglyceride did not show differences in both other groups. Enalapril-treated animals (ED and ES groups) did not show significant differences in baseline plasma triglyceride levels when compared to VD group ( $p > 0.05$  for all comparisons).

### **APÊNDICE III**

As displayed in figure 3B, the comparison between the areas under the triglyceride curves showed significant differences between enalapril-treated animals submitted to neuroglucopenic stress (ED group) and the other groups (VD and ES).

#### **Effects of 2DG injection on plasma cholesterol levels of enalapril-treated rats**

The three experimental groups (VD, ED and ES) did not exhibit significant differences in baseline cholesterol values ( $p > 0.05$ , Table 1). No significant changes were detected in cholesterol levels after 2DG or saline infusion in all experimental groups ( $p > 0.05$ , Figure 4A). As anticipated, the comparison between the areas under the cholesterol curves confirmed the absence of differences among the studied groups (Figure 4B).

## APÊNDICE III

### DISCUSSION

The role of RAS in metabolic homeostasis has been studied due to the widespread use of RAS inhibitors in clinical practice.<sup>11-13</sup> However, few studies have evaluated the RAS during stressful acute events.<sup>3,4,14-17</sup> In the present study, chronic treatment with the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, enalapril, did not alter the baseline levels of plasma glucose, insulin, triglycerides and cholesterol. In addition, the two week period of enalapril administration was not able to change the water intake and the weight gain of the animals, despite the possible interference with Angiotensin II dipsogenic effects.<sup>18 9</sup> On the other hand, the chronic treatment with enalapril changed the pattern of plasma insulin secretion and triglycerides release due to neurogluopenia, whereas plasma cholesterol levels and the hyperglycemic response to neurogluopenia were not significantly influenced by enalapril administration.

The mechanisms involved in the metabolic effects of ACE inhibition are poorly known. The reduction of angiotensin II probably plays a role in these effects. However, besides reducing angiotensin II synthesis, some actions of ACE inhibitors have been attributed to the rise in bradykinin and in angiotensin-(1-7) levels.<sup>19-22</sup> Interestingly, bradykinin also exhibits well known effects on glucose metabolism, acting on peripheral insulin activity and facilitating insulin-induced glucose uptake.<sup>19, 23</sup>

Our data, regarding plasma insulin secretion, should be also focused through the light of the local tissue RAS systems, which have been identified in most organs, covering both endocrine, paracrine and intracrine functions. More importantly, it has been described a local pancreatic RAS tissue acting on its endocrine and exocrine functions.<sup>24,25</sup> Carlsson *et al.* have demonstrated that the use of enalaprilat (an active

### APÊNDICE III

enalapril metabolite) and saralasin (an angiotensin II antagonist) increases pancreatic blood flow, while angiotensin II infusion conversely reduces the same flow, possibly affecting the first phase insulin secretion.<sup>26</sup> Likewise, Lupi et al has recently shown that RAS molecules are present in islets where their expression is sensitive to glucose concentration, and that ACE inhibitors protects human islets from glucotoxicity.<sup>27</sup>

Furthermore, there has been mounting evidence for angiotensin II participation in glucose metabolism.<sup>5,28,29</sup> Data coming from our group and others point to an attenuating action of the hyperglycemic response to stress associated with the use of angiotensin II receptor antagonists.<sup>4,15</sup> Prominent evidence points to a major AT1 receptor angiotensin II participation in hemorrhagic and immobilization stresses.<sup>3,4,14,17</sup> Yang *et al.* have demonstrated increased angiotensin II levels in several models of stress in rats, possibly due to an increase of renal sympathetic activity releasing renin, but also by the participation of the angiotensin II upon the sympathetic adrenal and hypothalamus-pituitary-adrenal axis.<sup>30</sup>

Interestingly, Bregonzio *et al.* and Talas and Yurekli have shown that angiotensin receptor blockers and enalapril treatment were able to prevent the increase of tyrosine hydroxylase activity in the adrenal medulla of rats exposed to cold stress, suggesting a possible attenuation of insulin-mediated inhibition of noradrenaline release by these treatments.<sup>16, 31</sup> Our data from the present study showed that plasma insulin response to neuroglucopenic stress was modified by enalapril treatment although no significant change in the hyperglycemic stress response could be observed. We postulate that the chronic treatment with enalapril might have attenuated the sympathetic response on insulin secretion, very likely by potentiating glucose-induced insulin secretion in this

### APÊNDICE III

experiment. Alternatively, a role of glucagon in the hyperglycemic response to 2DG infusion and its regulation by noradrenergic pathways could also be involved in this stress response regulation.<sup>32</sup>

After 2DG infusion, both stressed groups, enalapril-treated or not, showed an early and sustained hyperglycemic response. This extreme hyperglycemic response to neurocytoglucopenic stress was previously reported by our group and others, corroborating the pronounced hyperglycemic effect of intra-venous 2DG infusion.<sup>8,33</sup>

These altogether effects, coupled to the aforementioned interference in noradrenergic pathways, may explain the altered sympathetic-adrenal axis response accounting for the changes observed in the response of plasma insulin of the enalapril-treated stressed animals. Likewise, it was recently shown in obese subjects that enalapril treatment reduced sympathetic activity.<sup>34</sup> Similar data have been described with chronic bromocriptine treatment increasing parasympathetic response to neuroglucopenic stress.<sup>8</sup>

In the present study, it has also been observed that plasma triglyceride neuroglucopenic stress response was significantly modified by the chronic enalapril treatment. In enalapril-treated rats, an increase in triglyceride levels was observed after 2DG infusion while the controls showed no alteration of plasma triglyceride levels. These data point towards a major RAS role on triglyceride metabolism response to neuroglucopenic stress. Although still controversial, there are other studies that support a decrease in the triglyceride levels during stress.<sup>35-37</sup>

Neuroglucopenia, as other stress models, is related to high catecholamine levels that activate adipose hormone-sensitive tissue lipase, ultimately leading to prompt triglyceride mobilization for the plasma.<sup>38</sup> On the other hand, the triglycerides



### APÊNDICE III

degradation is performed by the endothelial lipoproteic lipase acting on triglycerides to release free fatty acids into the blood stream. During stress, the activity of this lipoprotein lipase is, apparently, tissue-specific and is inhibited in adipose tissue but activated in muscular tissue.<sup>39</sup> Thus, the adipose tissue takes up its function as an energy supplier to the other tissues, especially the muscular tissue which degrades triglycerides and captures free fatty acids, using them as an energy source. Our data suggest a change in this triglyceride response to neuroglucopenic stress by the chronic enalapril treatment. We though hypothesize that the chronic treatment with enalapril might have shut down the lipoproteic lipase activity. Further studies including free fatty acids (FFA) measurements should help clarify this issue, as a decrease in FFA is expected in the enalapril-treated stressed group. Otherwise, the 2DG neurocytoglucopenic stress as well as the chronic enalapril treatment did not show a significant change in plasma cholesterol levels, which remained constant throughout the experimental period, providing further evidence for no significant changes of cholesterol following a stress challenge.<sup>35</sup>

To the best of our knowledge, this study shows for the first time the influence of chronic enalapril treatment in the carbohydrate and lipid metabolism in rats exposed to neuroglucopenia. These new data concerning the influence of enalapril upon neuroglucopenic metabolic response shed light on the understanding of how an early response elicited by the chronic ACE inhibition in an acute stressful event may be related to sudden changes in metabolic regulation. We though emphasize that the early metabolic changes in neuroglucopenic stress response shown here may be helpful for understanding pathways involved in ACE inhibition during an acute stress event.

## APÊNDICE III

### Conclusions

These data show that chronic enalapril treatment changes insulin and triglycerides responses to neuroglucopenia, suggesting an effect upon glucose-induced insulin secretion and the storage of triglycerides.

### Acknowledgments

This study was financially supported by The Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) and CNPq.

### References

1. Machado LJ, Reis AM, Coimbra CC. Evidence of angiotensin II involvement in prolactin secretion in response to hemorrhage in adrenalectomized and guanethidine-treated rats. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:439-46.
2. Leong DS, Terrón JA, Falcón-Neri A et al. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT1a, AT1b and AT2 receptors. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 227-240.
3. Uresin AY, Erbas B, Ozek M. Losartan may prevent elevation of plasma glucose induced by chronic stress. *Polish Journal of Pharmacology* 2004; 56: 271-273.
4. Uresin Y, Erbas B, Ozek M et al. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004; 5: 93-96.
5. McFarlane SL, Kumar A, Sowers JR. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2003; 91: 30H-37H.
6. Coimbra CC, Gross JL, Migliorini RH. Intraventricular 2-deoxyglucose, glucose, insulin, and free fatty acid mobilization. *Am. J. Physiol.* 1979; 236: E317-E322.
7. Coimbra CC, Migliorini RH. Evidence for a longitudinal pathway in rat hypothalamus that controls FFA mobilization. *Am. J. Physiol.* 1983; 245: E332-E337.
8. Ribeiro-de-Oliveira Jr A, Guerra RM, Fóscolo RB et al. Effects of chronic bromocriptine (CB-154) treatment on the plasma glucose and insulin secretion response to neurocytotoxicity in rats. *J Endocrinol.* 1999; 162: 237-242, 1999.

**APÊNDICE III**

9. Britto RR, Santos RA, Fagundes-Moura CR et al. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 549-556.
10. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol.* 1974; 36(3):391-2.
11. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 1999; 20; 353(9153):611-6.
12. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359:1004–1010.
13. Yusuf S, Sleight P, Pogue J et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 145–153.
14. Machado LJC, Mihessen-Neto I, Marubayashi U et al. Hyperglycemic action of angiotensin II in freely moving rats. *Peptides* 1995; 16: 476-483.
15. Machado LJC, Marubayashi U, Reis AM et al. The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31: 1349-1352.
16. Bregonzio C, Armando I, Ando H et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevent gastric ulcer during cold-restraint stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018: 351-355.
17. Uresin AY, Tonyali H, Karamursel S. The effect of losartan and immobilization stress on heart rate variability and plasma corticosterone levels in rats. *Intern. J Neuroscience* 2003; 114: 365-379.
18. Fitzsimons JT. The renin-angiotensin system and drinking behavior. *Prog. Brain Res* 1975; 42: 215-33.
19. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR et al. ACE inhibition and glucose transport in insulin resistant muscle: roles of Bradykinin and nitric oxide. *Am.J. Physiol* 1999; 277: R332 – R336.
20. Souza Dos Santos RA, Passaglio KT, Pesquero JB et al. Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney blood vessels. *Hypertension* 2001; 38(3): 660-664.
21. Tom B, Dendorfer A, Jan Danser AH. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ace inhibitors: how do they interact? *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 335: 792-801.
22. Ribeiro-Oliveira Jr A, Nogueira AI, Pereira RM et al. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 787-803.
23. Beard KM, Lu H, Ho K et al. Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase. *Diabetes* 2006; 55: 2678-2687.
24. Leung PS, Chan WP, Wong TP et al. Expression and localization of rennin-angiotensin system in the rat pancreas. *J Endocrinol.* 1999; 160:13-19.

**APÊNDICE III**

25. Leung PS, Chappell MC. A local pancreatic renin-angiotensin systems: endocrine and exocrine roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 838-846.
26. Carlsson PO, Berne C, Jansson L. Angiotensin II and the endocrine pancreas. *Diabetologia* 1998; 41: 127-133.
27. Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M et al. The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:355-61.
28. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K et al. The adipose-tissue rennin-angiotensin-aldosterone system: role in metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 807-825.
29. Singh KN, Agarwal S, Chandra V. Hyperglycemic Effect of Angiotensin. *Ind J Pharmac* 1977; 9: 286-289.
30. Yang G, Wan Y, Zhu Y. Angiotensin II – an important stress hormone. *Biol Signals* 1996; 5: 1-8.
31. Talas ZS, Yurekli M. The effects of enalapril maleate and cold stress exposure on tyrosine hydroxylase activity in some rat tissues. *Cell Biochem Funct* 2006; 24: 537-40.
32. Karlsson S, Scheurink AJW, Ahren B. Gender difference in the glucagon response to glucopenic stress in mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002; 282: R281–R288.
33. Yamamoto H, Nagal K, Nakagava H. Time-dependent involvement of autonomic nervous system in hyperglycemia due to 2-deoxy-D-glucose. *Am J Physiol* 1988; 255: E928-E993.
34. Amador N, Guizar JM, Malacara JM et al. Sympathetic activity and response to ACE inhibitor (enalapril) in normotensive obese and non-obese subjects. *Arch Med Res* 2004; 35:54-8.
35. Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A et al. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulation lipoproteins in rat. *Metabolism* 2002; 51: 925-931.
36. Robertson RP, Smith PH. Stress-induced inhibition of triacylglyceride secretion in vivo in sand rats (*Psammomys obesus*). *Metabolism* 1976; 25: 1583-1590.
37. Starzec JJ, Berger DF, Mason EB et al. The effects of differential psychological stress and infantile handling on plasma triglyceride and aortic cholesterol in rats. *Psychosom Med* 1981; 6: 509-518.
38. McCann BS, Magee MS, Broyles FC et al. Acute psychological stress and epinephrine infusion in normolipidemic and hyperlipidemic men: effects on plasma lipid and apoprotein concentrations. *Psychosom Med* 1995; 57: 165-761.
39. Ricart-Jané D, Cejudo-Martín P, Peinado-Onsurbe J et al. Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1343-1351.



## APÊNDICE III

Table

**Table 1:** Daily water intake, two weeks weight gain and baseline values of plasma

	Groups		
	Water + 2DG (WD)	Enalapril + 2DG (ED)	Enalapril + Saline (ES)
Water intake (ml/100g of body weight/day)	21.3±3.6		24.4±6.8*
Weight variation (g)	57.9 ± 16.7		53.4±11.9*
Baseline plasma Glucose (mg/dl)	95.3 ± 5.2	98.6 ± 6.4	86.0 ± 7.7
Baseline plasma Insulin (ng/ml)	0.22 ± 0.06	0,44 ± 0.13	0,15 ± 0.05
Baseline Triglycerides (mg/dl)	25.3 ± 4.7	20.3± 3.5	24.4± 5.3
Baseline Cholesterol (mg/dl)	49.8 ± 9.2	60.1 ± 9.0	34.3 ± 9.9

glucose, insulin, triglycerides and cholesterol. \* Water intake and weight gain of both enalapril- treated groups were measured together.

p> 0.05 for all comparison data.

2DG = 2Deoxi-D-glucose

## APÊNDICE III

## Figures legends

**Figure 1: A.** Effects of neurocytotoxic stress on plasma glucose levels (absolute values) in rats chronically treated with enalapril. The values represent the mean  $\pm$  SEM of the individual observations for each of the groups: VD (10 rats chronically treated with vehicle and submitted to 2DG stress); ED (10 rats chronically treated with enalapril and submitted to neurocytotoxic stress); ES (7 rats chronically treated with enalapril and submitted to saline infusion). \*  $p < 0.05$  for comparison to respective baseline levels from each experimental group. **B.** Graphic representation of areas under plasma glucose curves. The values represent the means  $\pm$  SEM of the individual areas. \*  $p < 0.01$  for comparison between VD and ES or ED and ES groups.

**Figure 2: A.** Effects of neurocytotoxic stress on plasma insulin levels (absolute values) in rats chronically treated with enalapril. The values represent the mean  $\pm$  SEM of the individual observations for each of the groups: VD (10 rats chronically treated with vehicle and submitted to 2DG stress); ED (10 rats chronically treated with enalapril and submitted to 2DG stress); ES (7 rats chronically treated with enalapril and submitted to saline infusion). \*  $p < 0.05$  for comparison to respective baseline values; #  $p < 0.05$  for comparison between ED and VD groups. **B.** Graphic representation of areas under plasma insulin curves. The values represent the means  $\pm$  SEM of the individual areas. \*  $p < 0.05$  for comparison between ED and ES.

**APÊNDICE III**

**Figure 3: A.** Effects of neurocytoglucopenic stress on plasma triglyceride levels (absolute values) of rats chronically treated with enalapril. The values represent the mean  $\pm$  SEM of the individual observations for each of the groups: CD (10 rats chronically treated with the vehicle and submitted to 2DG stress); ED (12 rats chronically treated with enalapril and submitted to neurocytoglucopenic stress); ES (7 rats chronically treated with enalapril and submitted to saline infusion). \*  $p < 0.05$  for comparison to respective baseline values. **B.** Graphic representation of the areas under the plasma triglyceride curves. The values represent the means  $\pm$  SEM of the individual areas. \*  $p < 0.05$  for comparisons between ED and VD and comparisons between ED and ES.

**Figure 4: A.** Effects of neurocytoglucopenic stress on plasma cholesterol levels (absolute values) of rats chronically treated with enalapril. The values represent the mean  $\pm$  SEM of the individual observations for each of the groups: CD (10 rats chronically treated with vehicle and submitted to 2DG stress); ED (12 rats chronically treated with enalapril and submitted to 2DG stress); ES (7 rats chronically treated with enalapril and submitted to saline infusion).  $P > 0.05$  for all comparisons. **B.** Graphic representation of the areas under plasma cholesterol curves. The values represent the means  $\pm$  SEM of the individual areas.  $P > 0.05$  for all comparisons among groups.



APÊNDICE III

Figure 1

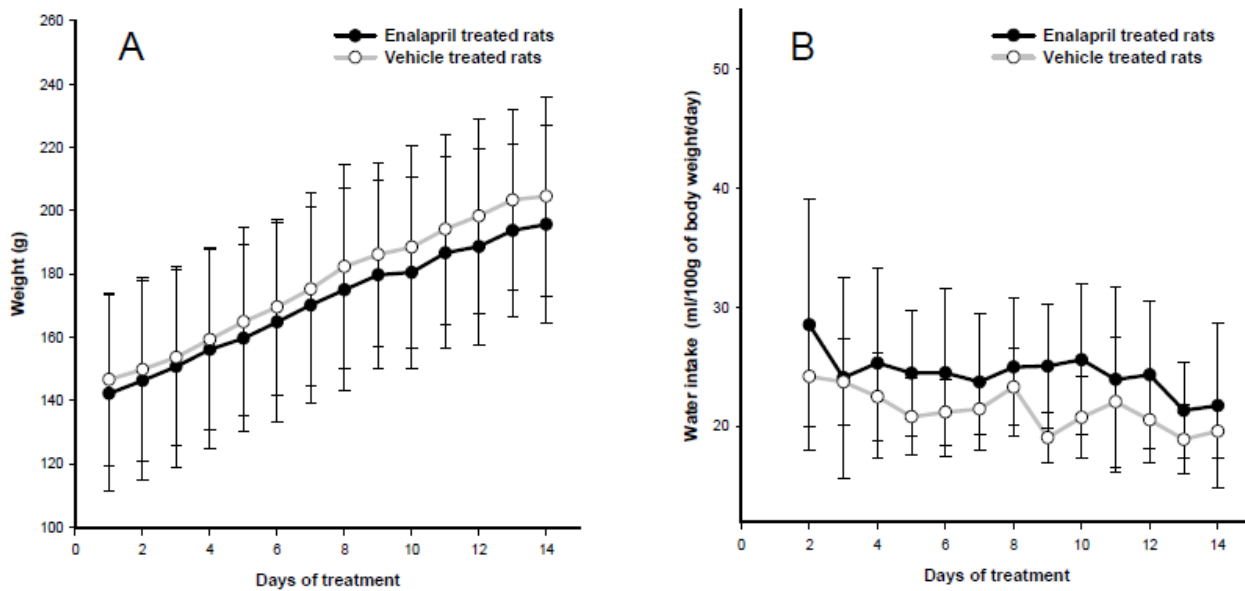
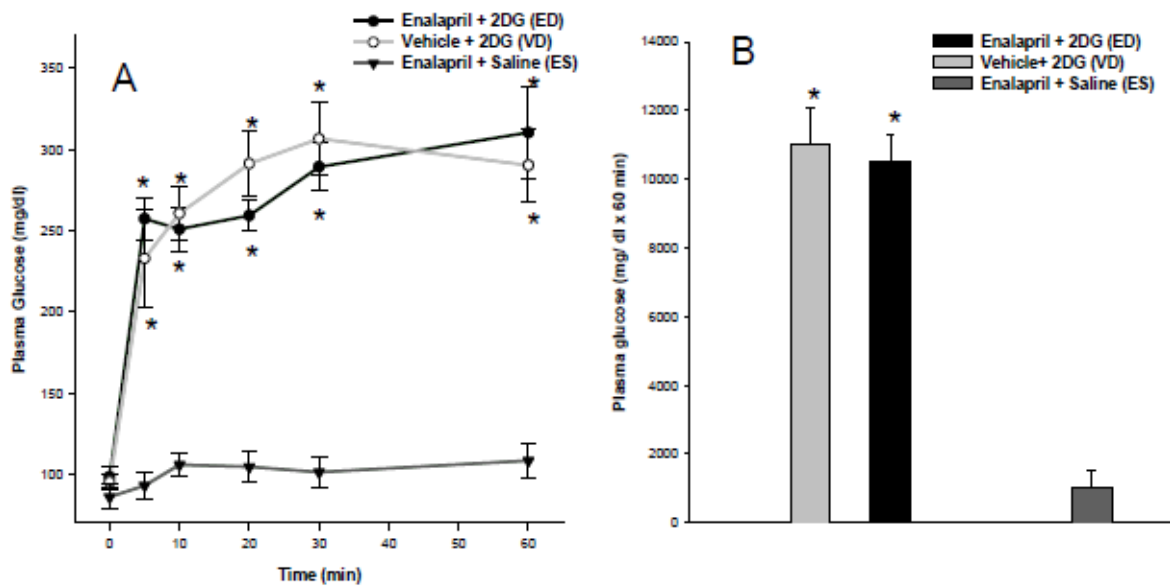


Figure 2



## APÊNDICE III

Figure 3

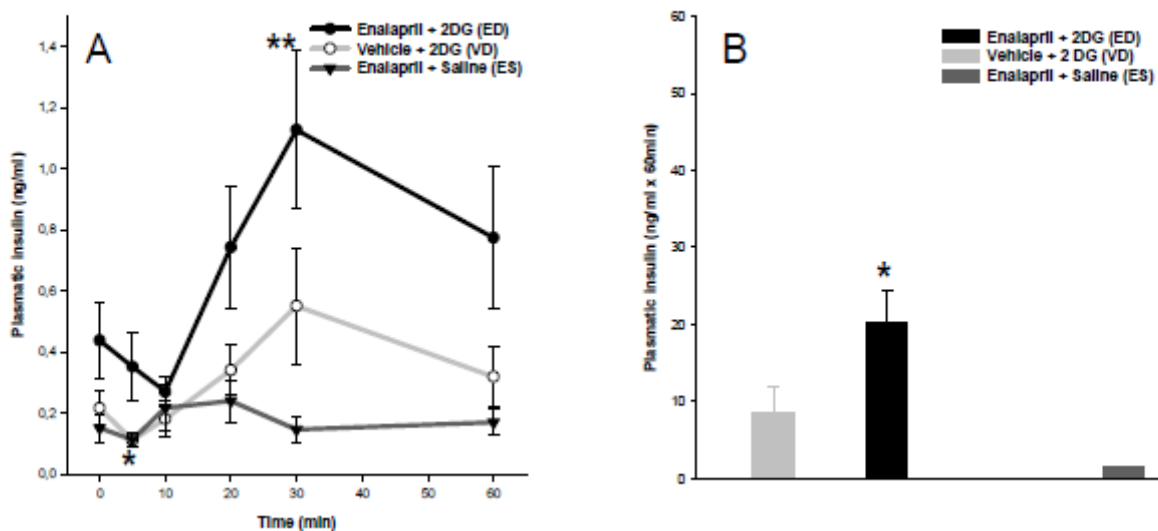
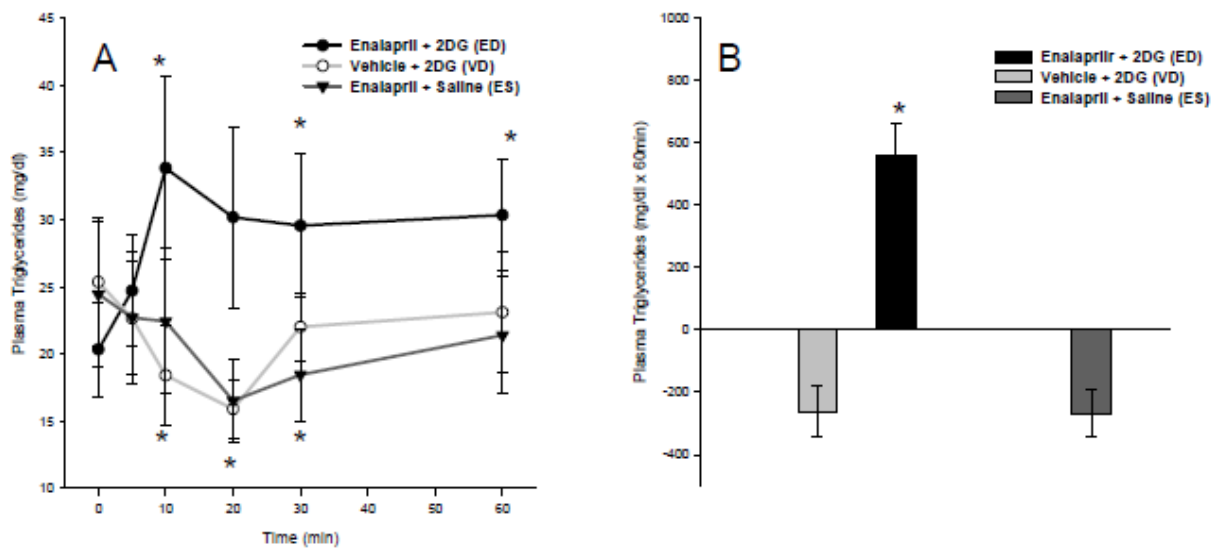


Figure 4



## APÊNDICE III

Figure 5

