

PAULO AUGUSTO CARVALHO MIRANDA

EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO
COM ENALAPRIL SOBRE A
CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE,
INSULINA E LIPÍDIOS DO PLASMA
DE RATOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE
NEUROCITOGLICOPÊNICO

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – Minas Gerais – Brasil

2006

PAULO AUGUSTO CARVALHO MIRANDA

EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO
COM ENALAPRIL SOBRE A
CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE,
INSULINA E LIPÍDIOS DO PLASMA
DE RATOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE
NEUROCITOGLICOPÊNICO

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – Minas Gerais – Brasil

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor
Ronaldo Tadeu Pena

Pró-Reitor da Pós-graduação
Jaime Arturo Ramirez

Pró-Reitor de Pesquisa
Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor
Francisco José Penna

Vice-Diretor
Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-graduação
Carlos Faria Santos Amaral

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Chefe do Departamento
Dirceu Bartolomeu Greco

Coordenador do Programa de Pós-graduação
Carlos Faria Santos Amaral

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Carlos Faria Amaral (Coordenador)
Prof^a. Maria da Consolação Vieira Moreira (Subcoordenadora)

Prof. Antônio Carlos Martins Guedes
Prof. Marcus Vinícius de Melo Andrade
Prof. Nilton Alves de Rezende
Prof^a. Suely Meireles Rezende

Representante Discente: Elizabete Rosária de Miranda

Dissertação defendida publicamente no Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Universidade Federal de Minas Gerais, e aprovada pela seguinte Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

(Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof. Dr. Lucas José Campos Machado

(Depto. de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG)

Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior

(Depto. de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG)

Belo Horizonte, 12 de Dezembro de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e à Luciane
pelo amor, apoio e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, pelos ensinamentos e amizade. Exemplo da união de médico e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra que colaborou de forma fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Bastos Fóscolo pela disponibilidade em colaborar na análise estatística deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio sempre pronto quando necessário.

RESUMO

Efeito do Estresse Neurocitoglicopênico na Glicemia, Insulina e Lipoproteínas em Ratos Tratados Cronicamente com Enalapril.

Fundamentação: A neurocitoglicopenia induzida pela 2-deoxi-D-glicose (2DG) ativa glicorreceptores hipotalâmicos com conseqüente aumento do fluxo simpático para o fígado, pâncreas, medula da supra-renal e tecido adiposo, o que resulta no aumento da produção hepática de glicose, inibição da secreção de insulina e mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo. Evidências vem se acumulando sobre a participação do Sistema-Renina-Angiotensina (RAS) na regulação metabólica, em particular da glicose e lipídios. Contudo, a participação desse sistema no estresse agudo ainda não esta bem esclarecida.

Objetivo: O objetivo deste estudo é determinar o efeito do tratamento crônico com enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), sobre a glicemia, insulina plasmática e lipídios plasmáticos em resposta ao estresse neurocitoglicopênico induzido pela 2DG em ratos. Materiais e Métodos: Foram utilizados ratos Holtzman machos tratados diariamente com enalapril (10 mg/kg de peso corporal) por via oral, por duas semanas (grupo ED) ou veículo (grupo CD). Foi implantado um cateter atrial através da veia jugular externa dos animais sob anestesia por éter, dois dias antes do experimento para realização das colheitas de sangue. No dia do experimento, os ratos tinham seus cateteres venosos conectados a um tubo de polietileno (PE 50) e preenchidos com solução salina. Após uma hora de repouso nas suas gaiolas, amostras de sangue foram colhidas antes e 5, 10, 20, 30, 60 minutos depois da infusão de 2DG (500 mg/kg de peso corporal). Como grupo experimental controle (ES) foram utilizados ratos tratados com enalapril nas concentrações supracitadas e submetidos à infusão de salina, seguindo o mesmo protocolo. Resultados: Os ratos tratados com enalapril (grupos ED e ES) não demonstraram diferença significativa nos valores basais quando comparados ao grupo controle (grupo CD). Após a infusão de 2DG observou-se uma resposta hiperglicêmica marcante, que não foi alterada pelo tratamento com enalapril (ED x CD, NS). Foi observado um valor máximo de secreção de insulina mais elevado no grupo tratado com enalapril (ED), quando comparado com os controles (CD e ES), sugerindo um aumento na resposta da secreção de insulina induzida pela glicose neste grupo de ratos. A resposta dos triglicérides plasmáticos ao estímulo da 2DG mostrou elevação de seus níveis apenas no grupo ED (ED x CD, $p < 0,05$) e, uma redução dos mesmos nos grupos CD e ES significativo aos 10 e 30 min respectivamente ($p < 0,05$). Por outro lado, não foram observados diferenças nos níveis de colesterol entre os grupos durante o experimento.

Conclusões: Este estudo demonstra que o tratamento crônico com enalapril modificou o padrão de resposta da insulina e triglicérides plasmáticos à neuroglicopenia, sem alterar a resposta hiperglicêmica, sugerindo uma influência do bloqueio do RAS na secreção de insulina glicose-induzida e na mobilização de triglicérides durante o estresse neurocitoglicopênico.

Palavras-Chave: Estresse, Neuroglicopenia, Angiotensina, Inibidor da ECA e 2-deoxi-D-glicose.

ABSTRACT

Effects of Neurocytoglucopenic Stress on Plasma Glucose, Insulin and Lipoprotein Levels in Rats Chronically Treated with Enalapril.

Background: Neurocytoglucopenia induced by 2-deoxy-D-glucose (2DG) activates hypothalamic glucoreceptors with a consequent increase in sympathetic outflow to liver, pancreas, adrenal medulla and adipose tissue which results in increased hepatic glucose production, insulin inhibition and free fatty acid mobilization from adipose tissue. Evidence has been accumulated to the participation of the renin-angiotensin system (RAS) on metabolic regulation, particularly on glucose and lipids. However, the participation of this system on acute stress is still not well understood. **Objectives:** The aim of this study is to determine the effects of the chronic treatment with enalapril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, upon plasma glucose, insulin and lipids levels in response to neurocytoglucopenia induced by 2DG in rats. **Methods:** Adult male Holtzman rats were treated daily, *o.r.*, with enalapril (10 mg/kg body wt) for two weeks (ED) or vehicle (CD). The animals had atrial catheters inserted through the jugular vein under ether anesthesia two days before 2DG infusion in order to collect blood samples. On the day of the experiments, the rats had their venous catheters rinsed and connected to polyethylene tubes (PE 50) filled with saline. After one hour of resting in their homecages, blood samples were drawn before and 5, 10, 20, 30 and 60 minutes following 2DG infusion (500 mg/kg body wt). As a control group (ES), rats were treated daily with the same amount of enalapril for the same period and submitted to a saline infusion following the same protocol. **Results:** The rats treated with enalapril (ED and ES groups) did not show significant differences in all basal values when compared to control animals (CD group). There was however a strong hyperglycemic response to 2DG that was not changed significantly by enalapril treatment (ED and CD, NS). It was shown higher peak stress of plasma insulin concentrations in the group of rats treated with enalapril when compared to controls, suggesting an enhanced glucose stimulated insulin secretion in these groups of rats. Besides plasma triglyceride response to 2DG having showed a significant stress increase only in the ED group (ED and CD, $p < 0,05$), the CD and ES groups showed a drop on plasma triglyceride levels that reached significant decrease at 10 and 30 min, respectively ($p < 0,05$). On the other hand, plasma cholesterol levels did not change during the experiments. **Conclusions:** These data show that chronic enalapril treatment changes the pattern of insulin

and triglycerides response to neuroglucopenia without modifying the hyperglycemic response to 2DG, pointing to an alteration determined by RAS blockade upon glucose-induced insulin secretion and the storage of triglycerides content during a neuroglucopenic challenge.

Key words: Stress, Neuroglucopenia, Angiotensin, ACE inhibitors and 2-deoxy-D-glucose.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DG	2-deoxi-D-glicose
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Proteína cinase B
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ARBs	Antagonistas do receptor AT ₁
AVP	Arginina-vasopressina
CART	Cocaine and amphetamine-regulated transcript
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DMN	Núcleo dorsomedial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GLUT4	Transportador de glicose 4
HMG-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina

LH	Hipotálamo lateral
NEP	Endopeptidase neutra
NPY	Neuropeptídeo Y
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PEP	Prolil-endopeptidase
PVN	Núcleo paraventricular
RAS	Sistema renina-angiotensina
Receptor AT1	Receptor de angiotensina II 1
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VMH	Núcleo ventromedial.

LISTA DE FIGURAS

Figuras

Figura 1.1 – Vias de síntese e metabolismo das angiotensinas e bradicininas.....	25
Figura 3.1 - Avaliação do ganho ponderal de 12 ratos tratados durante um período de 14 dias com solução de enalapril a 5% por via oral e 12 ratos controle tratados com água.....	35
Figura 3.2 - Avaliação comparativa da ingestão de líquidos de 12 ratos tratados durante um período de 14 dias com solução de enalapril a 5% por via oral e 12 ratos controle tratados com água.....	36
Figura 4.1 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de glicemia plasmática (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril.....	42
Figura 4.2 - Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de glicemia.....	43
Figura 4.3 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de insulina plasmática (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril.....	45
Figura 4.4 - Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas	

de insulina.....	46
Figura 4.5 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de triglicérides plasmáticos (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril.....	48
Figura 4.6 - Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de triglicérides plasmáticos.....	49
Figura 4.7 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de colesterol plasmático (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril.....	51
Figura 4.8 - Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de colesterol plasmático.....	52

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	17
1.1 - O estresse e a ativação de vias metabólicas.....	18
1.2- Estresse neurocitoglicopênico	21
1.3- Sistema renina-angiotensina	22
1.4 – Participação do Sistema Renina-Angiotensina no metabolismo e vias de sinalização da resposta ao estresse.....	26
2.0 - OBJETIVO GERAL.....	30
3.0- MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 - Delineamento Experimental.....	31
3.2 – Animais.....	31
3.3 - Tratamento com Enalapril.....	32
3.4 - Avaliação da ingestão hídrica e ganho de peso entre os grupos.....	33
3.5 - Colheita de Sangue.....	37
3.6 - Estresse Neurocitoglicopênico por 2-Deoxi-D-Glicose (2DG).....	38
3.7 - Grupos Experimentais	38
3.8 - Métodos de Análise Química.....	39
3.8.1 - Determinação da Glicose Plasmática	39
3.8.2 – Determinação do Triglicérideo Plasmático.....	39
3.8.3 - Determinação do Colesterol Plasmático.....	39
3.8.4 - Determinação da Insulina Plasmática	39
3.9 - Tratamento estatístico dos resultados.....	40

3.10 – Aprovação em Comitê de Ética.....	40
4.0 – RESULTADOS.....	41
4.1 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre a glicose plasmática.....	41
4.2 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre a insulina plasmática.....	44
4.3 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os triglicérides.....	47
4.4 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis plasmáticos de colesterol.....	50
5.0 – DISCUSSÃO.....	53
5.1 - Tratamento crônico com inibidor da enzima conversora de angiotensina (Enalapril).....	53
5.2 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre a glicemia e, insulina, triglicérides e colesterol plasmáticos de ratos tratados cronicamente com enalapril.....	56
6.0 – CONCLUSÕES.....	64
7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE A.....	73

1- INTRODUÇÃO

O estudo do estresse tem sido alvo de grande atenção nas últimas décadas e o esclarecimento de suas vias neurohumorais e metabólicas vem colaborando para o entendimento de processos fisiopatológicos. O progresso no entendimento dos modelos experimentais de estresse demonstra que a resposta a estes estímulos pode ser específica ou generalizada, sendo que as do último tipo ocorrem quando a intensidade dos estímulos estressores é de grande magnitude (PACAT, 2001). A neurocitoglicopenia induzida pela 2-deoxi-D-glicose (2DG) tem sido comumente utilizada como modelo de estresse metabólico em estudos envolvendo a regulação neural do metabolismo intermediário.

A participação do sistema renina-angiotensina (RAS) na resposta a determinados modelos de estresse vem sendo estudada atualmente. Sua importância no estresse hemorrágico e estresse de imobilização foram descritas anteriormente (MACHADO, 1995; LEONG ,2002; URESIN, 2004). A relevância deste sistema na etiologia de vários processos patológicos como aterosclerose, *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, entre outros, o coloca em posição ímpar no desenvolvimento da medicina. Sabendo-se também que o estresse se relaciona com as doenças supracitadas, o melhor entendimento da participação deste sistema nas vias de sinalização e resposta ao estresse é de grande importância.

Este estudo experimental tem como objetivo avaliar a participação do sistema renina-angiotensina na variação da glicemia e concentrações plasmáticas de insulina, triglicérides e colesterol em resposta ao estresse neurocitoglicopênico.

1.1 - O estresse e a ativação de vias metabólicas

A sobrevivência dos seres vivos depende da obtenção e manutenção de circunstâncias ótimas para o seu bem-estar. Em um ambiente favorável os indivíduos podem demandar energia para a promoção do crescimento, desenvolvimento e sobrevivência da espécie, tais como a ingestão alimentar e o ato sexual (CHROUSOS, 1992; 1998). Quando as condições ambientais são menos favoráveis, os indivíduos procuram se adaptar enquanto buscam condições mais vantajosas.

As respostas adaptadoras ou homeostáticas são direcionadas para proteção do meio interno contra mudanças que ameaçam a sobrevivência das células e sistemas corporais. Estas respostas adaptadoras são proporcionais à intensidade do estímulo e variam desde uma simples reação localizada até a um estado generalizado e sistêmico que acaba por afetar o organismo como um todo. As respostas adaptadoras de um indivíduo frente às demandas e ameaças excessivas freqüentemente atingem um padrão não específico e estereotipado que é conhecido por estresse (HABIB, 2000). O estresse é assim definido como um estado no qual o cérebro interpreta a quantidade de estímulo como excessiva ou a sua qualidade como ameaçadora, causando assim uma

resposta do tipo generalizada ou estereotipada. Os estressores físicos, biológicos ou psicológicos geralmente precipitam respostas similares referidas há muito (SELYE, 1936) como síndrome geral de adaptação ao estresse.

Durante o estresse, o débito cardíaco e a frequência respiratória encontram-se elevados, o fluxo sanguíneo é redirecionado para a oferta de maior perfusão para o cérebro e para o sistema muscular. O cérebro focaliza sobre a ameaça percebida e age através de um amplo circuito cerebral que pode ser ativado por vias diferentes de entrada e de acordo com o tipo e intensidade do estímulo estressor, apesar da existência de um padrão de resposta estereotipada conforme o descrito por Selye (1936). Além disso, a programação endócrina do prazer e crescimento é coibida em função de uma preservação energética. O catabolismo é aumentado e o substrato energético é utilizado principalmente para o cérebro, coração e músculos.

As mudanças metabólicas que ocorrem durante o estresse envolvem a secreção de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal e os nervos simpáticos. Ambos os hormônios foram associados com a resposta do tipo “luta ou fuga” descritas por Cãnon, em 1914. O eixo hipotálamo – hipófise – adrenal e o sistema simpatoadrenal servem como as vias periféricas através das quais o cérebro influencia cada célula do corpo durante a exposição a um estímulo ameaçador.

Por outro lado, o estresse vem sendo descrito como causador de um estado de imunossupressão (ELENKOV, 1999). Estudos recentes têm mostrado que o

estresse pode estimular a imunidade humoral e suprimir a imunidade celular. Esta resposta é mediada por um efeito dos hormônios de estresse, glicocorticóides e catecolaminas, sobre as células T-auxiliares-1/T-auxiliares-2 e a produção de citocinas do tipo -1/ tipo-2. Através destes mecanismos, o estresse pode influenciar o início e o curso das doenças infecciosas, autoimunes /inflamatórias, alergias e doenças neoplásicas (ELENKOV, 1999).

A ação orquestrada de vários sistemas de neurotransmissores no cérebro determina a fenomenologia característica das respostas comportamentais, endócrinas, viscerais, autonômicas e imunes ao estresse. Estes neurotransmissores incluem o CRH, AVP, peptídeos opióides, dopamina e norepinefrina. Na hipoglicemia induzida por insulina observamos além de uma importante ação controladora do AVP sobre CRH, a marcante participação de centros reguladores do apetite, com ativação dos sistemas orexigênicos e do circuito insulina-leptina-CART (PACAT, 2001). É descrito também um aumento da secreção hipofisária de prolactina (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 2001) e a secreção pancreática de glucagon. Além disso, ocorre uma redução da secreção de NPY cerebral e uma reduzida liberação hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). No estresse hemorrágico, ocorre ainda uma ativação marcante do sistema renina angiotensina (MACHADO, 1995).

A manutenção de um nível constante de glicemia é essencial para a manutenção das funções fisiológicas do corpo, principalmente para o Sistema Nervoso Central (SNC), já que o cérebro não produz nem armazena glicose o suficiente para seu gasto energético (CRYER, 1994). Em condições normais,

trinta por cento da glicose produzida pelo fígado é consumida pelo SNC. A homeostase glicêmica é mantida por um complexo mecanismo neuroendócrino, envolvendo o sistema simpático, fígado, pâncreas e glândula adrenal.

Os efeitos do estresse agudo sobre os lipídios ainda é alvo de grande discussão. Sabe-se que em geral existe uma resposta periférica de mobilização de ácidos graxos livres, contudo pouco se sabe sobre o perfil do colesterol e triglicerídeos plasmáticos na resposta a modelos de estresse. Apesar de existirem vários estudos abordando este tópico, a utilização de dietas específicas, gêneros e pesos diferentes, faz com que os resultados sejam contraditórios e ainda por se definir. De interesse, o estresse de imobilização de forma aguda e crônica causou uma redução nos triglicerídeos plasmáticos em ratos tratados com ração balanceada com 58% de carboidratos, 17% de gorduras e 4,3% de proteínas. Este resultado sugere um efeito do estresse sobre a ação da lipase lipoprotéica (RICART-JANÉ, 2002).

1.2- Estresse neurocitoglicopênico

Vários são os modelos de estresse utilizados para o estudo do metabolismo. A neurocitoglicopenia induzida pela 2-deoxi-D-glicose, um análogo de glicose não metabolizável que bloqueia efetivamente a utilização de glicose pelo neurônio, ativa glicorreceptores hipotalâmicos com conseqüente aumento do tônus simpático para o fígado, pâncreas, medula da adrenal e tecido adiposo, resultando num aumento da produção hepática de glicose, inibição da secreção

de insulina, estimulação da secreção de glucagon, epinefrina e norepinefrina, e mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo (COIMBRA, 1979; COIMBRA & MIGLIORINI, 1983).

Com a exposição à hipoglicemia profunda, ocorrem alterações neurofisiológicas e neuropsicológicas que se implantam rapidamente. Estas incluem confusão, perda de consciência e convulsão. Outros sintomas como fome, sudorese, tremores, agitação, frio ou sensação de calor reflete a ativação do sistema adrenomedular. Em associação com ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, este sistema efetor do estresse aumenta a glicemia periférica e direciona a glicose para o cérebro para a manutenção de seus processos vitais para a sobrevivência do organismo (PACAK, 2001).

Sabendo-se que a hipoglicemia e a neurocitoglicopenia acompanham o curso do tratamento de uma desordem prevalente em nosso meio que é o diabetes mellitus e que a neurocitoglicopenia muitas vezes ocorre sem a percepção do indivíduo (TOWLER, 1993), uma melhor compreensão fisiopatológica das situações de estresse envolvendo neurocitoglicopenia, como as utilizadas neste projeto, implicarão numa melhor abordagem destes distúrbios (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 1999).

1.3- Sistema renina-angiotensina

Angiotensinas são hormônios peptídeos derivados da proteína precursora angiotensinogênio através da ação seqüencial de enzimas proteolíticas

(GOODFRIEND, 1996). A via mais conhecida do RAS envolve a transformação de angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) pela renina e a seguinte conversão de Ang I para Angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Contudo, sabe-se atualmente que este sistema envolve outros peptídeos e enzimas. Angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina-(1-7) são peptídeos biologicamente ativos originados do angiotensinogênio, sendo o último de grande interesse na fisiologia cardiovascular (THOMAS, 2003 e SIMÕES E SILVA, 2006). As vias de inter-relação entre estes peptídeos se formam a partir de uma série de peptidases sendo a Ang-(1-7) formado a partir da Ang I pela endopeptidase neutra 24.11 (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP), ou a partir da Ang II via PEP, prolil-carboxipeptidase ou pela enzima conversora de angiotensina II (ECA2), que é homóloga a ECA em humanos, ratos e camundongos (Simões e Silva et al, 2004). Aparentemente a Ang-(1-7) exerce um papel de contrabalanço do sistema em relação à Ang II (SANTOS, 2003 A).

O Sistema renina-angiotensina também se inter-relaciona diretamente com o Sistema Cinina-Calicreina, uma vez que a bradicinina, um peptídeo com importantes ações cardiovasculares e metabólicas, é metabolizado pela ECA (TOM, 2003). Com a descoberta e uso cada vez mais freqüente dos Inibidores da ECA (IECA), o papel da bradicinina como moduladora de vários mecanismos regulatórios cardiovasculares via receptores B2 foi demonstrado (CAMPBELL, 2003 e TOM, 2003). Henriksen em 1999, também ressalta o possível papel da bradicinina na ação periférica da insulina, facilitando a

captação de glicose insulino-induzida principalmente em situações de resistência à insulina.

Os componentes do Sistema renina-angiotensina e suas inter-relações, assim como suas relações com o Sistema cinina-caliceína estão demonstradas de forma esquemática na figura 1.1.

1.4 – Participação do Sistema Renina-Angiotensina no metabolismo e vias de sinalização da resposta ao estresse

Além dos efeitos conhecidos do sistema renina angiotensina na homeostasia hidroeletrólítica e cardiovascular, existem evidências da participação das angiotensinas na regulação metabólica, em particular, dos carboidratos e lipoproteínas. Foi demonstrado que o sistema renina angiotensina tem um importante papel fisiológico na regulação da glicemia, já que a angiotensina II produz uma resposta hiperglicêmica dose-dependente, e, em contraste, a infusão intravenosa de antagonista de angiotensina II apresenta um efeito inibitório sobre a resposta hiperglicêmica ao estresse hemorrágico (MACHADO, 1995). Em estudo desenvolvido por Singh *et al.* (1977) observou-se que a infusão intracerebro-ventricular de angiotensina II em coelhos, promove uma resposta hiperglicêmica que é abolida pelo uso de reserpina associado à vagotomia medular, reduzida em grande parte pela adrenalectomia bilateral, contudo não sofrendo interferência da vagotomia bilateral.

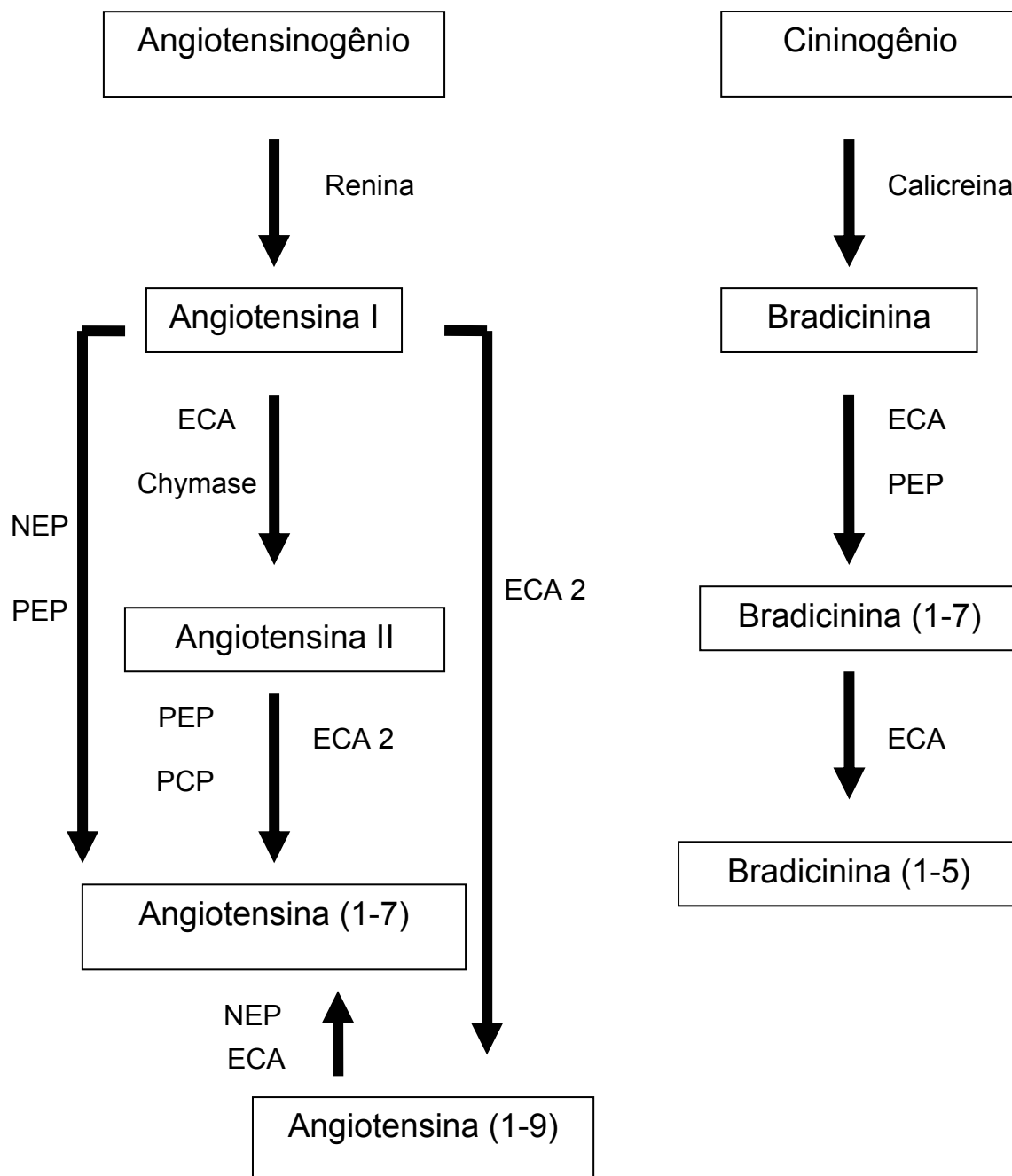


Figura 1.1: Vias de síntese e metabolismo das angiotensinas e bradicininas. ECA, Enzima conversora de angiotensina; ECA 2, Enzima conversora de angiotensina 2; NEP, Endopeptidase neutra; PEP, Prolil-endopeptidase; PCP, Prolil-carboxipeptidase.

Foi demonstrado também que o receptor de angiotensina II que encontra-se envolvido direta e indiretamente nas ações hiperglicêmicas deste hormônio é o do tipo AT1 (MACHADO, 1998), receptor este já anteriormente identificado no fígado. Da mesma forma, Uresin *et al.* (2003 e 2004) demonstraram que o losartan reduz a secreção de corticosterona induzida pelo estresse de imobilização agudo e crônico, assim como previne a resposta hiperglicêmica apresentada em resposta ao estresse de imobilização crônico. Por outro lado, estudos têm mostrado um aumento da expressão do receptor AT1 na hipercolesterolemia (STREHLOW, 2000), um achado que pode ser revertido através do tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase. Os receptores do sistema renina angiotensina foram identificados, além do fígado, no pâncreas, adrenais (tanto na medula quanto no córtex), hipófise, hipotálamo e demais áreas do SNC, rins e tecido adiposo, tendo nestes órgãos, importantes ações participativas no metabolismo de carboidratos (MACHADO, 1995; MCKINLEY, 2003).

No sistema nervoso central, a angiotensina II tem importante ação na modulação da secreção de CRH que, por sua vez, tem posição de destaque na resposta ao estresse. A administração central de antagonista de receptor AT1 inibe a atividade simpática e reduz a pressão arterial em certas condições fisiológicas a patofisiológicas, assim como interrompe a ingestão hídrica, o apetite por sódio, a secreção de vasopressina, a excreção de sódio, a secreção de renina e a termorregulação (MCKINLEY, 2003). Já o estresse de imobilização se mostrou como um modulador de expressão de receptores

AT1a na hipófise e hipotálamo, além de regular a expressão de receptores AT1b no córtex adrenal (LEONG, 2002).

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) são um grupo de medicamentos descoberto ao final dos anos 70, sendo, na atualidade, largamente utilizados como anti-hipertensivos, nas terapias da insuficiência cardíaca e da nefropatia diabética. Seus efeitos metabólicos benéficos, principalmente sobre os carboidratos, são amplamente difundidos, constituindo hoje, primeira linha no tratamento de hipertensos diabéticos (VII RELATÓRIO DO JOINT NATIONAL COMMITTEE, 2003). Estudos recentes têm proposto que os inibidores da enzima conversora de angiotensina, assim como antagonistas de receptores AT1, possam reduzir o risco de novo diagnóstico de diabetes em indivíduos sem história desta doença (HANSSON, 1999; YUSUF, 2001; LINDHOLM, 2002). Da mesma forma, outros estudos (LONN, 2000) mostraram um menor aumento de glicemia de jejum quando se usa o inibidor da ECA se comparado ao placebo. Um dos mecanismos propostos para esta ação dos inibidores da ECA sobre o metabolismo de carboidratos seria uma redução da secreção de aldosterona e conseqüentemente da perda de potássio pelos rins, o que poderia preservar a sensibilidade das células beta. De outra maneira, estes efeitos poderiam ser explicados a partir de um aumento no fluxo sanguíneo para as ilhotas e da perfusão das células beta pancreáticas, reduzindo a vasoconstrição mediada pela angiotensina II no pâncreas (CARLSSON, 1998; LEUNG, 2003).

Há evidências (HENRIKSEN, 1995; 1999) de uma redução da resistência insulínica determinada pelos inibidores da ECA ao nível da musculatura esquelética a partir de um aumento do óxido nítrico mediado pelas bradicininas. Foi ainda mostrado (TORLONE, 1991) que os inibidores da ECA podem reduzir a resistência insulínica no fígado e adipócitos, o que causa uma redução na produção hepática de glicose e diminuição dos níveis dos ácidos graxos livres circulantes. Estudos recentes sugerem que angiotensina II age de forma deletéria nas vias de sinalização de insulina por inibir direta e indiretamente a ação da proteína cinase B (AKT), reduzindo a expressão do GLUT4 e, assim diminuindo o transporte de glicose insulino-dependente (McFARLANE, 2003).

O acúmulo dos dados apontados acima sugere uma redução do risco de desenvolvimento de diabetes a partir do uso dos inibidores da ECA, o que requer confirmações a partir de estudos de maior impacto, dado ao enorme potencial destes resultados em termos clínicos e de saúde pública.

Contudo poucos são os estudos que procuram elucidar as vias nas quais os IECA e os bloqueadores de angiotensina II interferem no metabolismo em situações de estresse, apesar de se saber da importância do estresse como fator precipitante de doenças, inclusive o diabetes mellitus.

Recentemente, grande parte do interesse tem sido voltada para o papel do sistema renina angiotensina sobre a evolução dos processos ateroscleróticos (KEIDAR, 1998; HOLTZ, 1994; ARAKAWA, 2000). Sabemos hoje que a angiotensina II tem ação importante nas vias de oxidação do óxido nítrico e

conseqüente redução da complacência vascular, processo fundamental na doença aterosclerótica (McFARLANE, 2003). No entanto, pouco é conhecido da sua ação sobre a resposta dos lipídios aos modelos de estresse agudo.

As evidências acumuladas sobre o sistema renina-angiotensina sinalizam para sua grande importância no metabolismo, assim como no controle homeostático corporal. A avaliação deste sistema em modelos de estresse acrescenta em muito no entendimento das vias fisiológicas pelas quais ele interfere e regula respostas vitais à sobrevivência dos indivíduos. Desta forma o presente estudo teve como o objetivo geral a investigação da ação do sistema renina-angiotensina sobre a glicemia, secreção de insulina e, triglicerídeos e colesterol plasmáticos em resposta ao estresse por neurocitoglicopenia em ratos.

2.0 - OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo investigar o efeito do uso crônico de inibidor da enzima conversora de angiotensina, enalapril, sobre os níveis plasmáticos de glicose, insulina, triglicérides e colesterol em ratos submetidos ao estresse neurocitoglicopênico pela infusão de 2-deoxi-D-glicose.

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados utilizando-se três grupos de ratos, um tratado cronicamente (14 dias) com solução de enalapril (IECA), e submetido ao estresse neurocitoglicopênico. Como grupos controles foram utilizados dois grupos de ratos, um tratado cronicamente com veículo (água) e submetido ao estresse neurocitoglicopênico e outro grupo de ratos tratados cronicamente com enalapril e não submetidos ao estresse neurocitoglicopênico. A neurocitoglicopenia foi induzida por injeção venosa de 2-deoxiglicose (2DG), um inibidor competitivo da glicose que promove citoglicopenia do sistema nervoso central, induzindo hiperglicemia através do aumento da atividade simpático-adrenal. Esta técnica tem sido comumente utilizada em estudos envolvendo a regulação neural do metabolismo intermediário.

3.2 - Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos Holtzman, machos, pesando entre 170 e 230g, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina-UFMG, local onde foram mantidos durante os 14 dias de tratamento. Os animais tinham livre acesso à água e à ração padronizada (Nuvilab Nutrientes Ltda, Paraná, Brasil). Ao atingirem o peso entre 120 e 170g os ratos foram

colocados em gaiolas individuais, sendo realizadas medidas de peso e ingestão hídrica diariamente. Os experimentos foram realizados entre 8 e 12h no Laboratório de Pesquisas em Endocrinologia da Faculdade de Medicina da UFMG, em sala equipada para realização de experimentos sob controle de temperatura.

3.3 - Tratamento com Enalapril

O tratamento crônico com inibidor de enzima conversora de angiotensina foi realizado por via oral, com enalapril (Merck) na dose de 10mg/kg de peso/dia (BRITTO,1997) por meio de solução a 5% em água. A solução de enalapril era oferecida *ad libitum* através de bebedouro graduado, durante 14 dias. Aos animais controle foi oferecido *ad libitum* água de torneira. O volume de água ou solução de enalapril ingerida pelos animais foi medida diariamente.

Uma hora antes do experimento (estresse neurocitoglicopênico), os animais tratados cronicamente com enalapril receberam dose única endovenosa de 5mg/kg enalapril (BRITTO, 1997), por meio de solução a 5% em salina (NaCl 0,9%) como reforço do tratamento crônico instituído. O grupo de animais controle recebeu infusão de salina (NaCl 0,9%) seguindo o mesmo protocolo.

3.4 - Avaliação da ingestão hídrica e ganho de peso entre os grupos

Antes do início dos experimentos foi realizado estudo piloto para avaliação da aceitabilidade da solução aquosa de enalapril pelos animais e seus possíveis efeitos sobre o metabolismo hídrico e sobre o seu ganho de peso. Seguindo-se o mesmo protocolo proposto pelo estudo, os animais foram colocados em gaiolas individuais e avaliados por 14 dias. Foram oferecidos livremente água ou solução aquosa de enalapril a 5% a grupos de 12 ratos equivalentes em peso, através de bebedouro graduado. A ingestão hídrica e peso foram medidos diariamente. Ao final do estudo piloto não foi observado diferença significativa entre os dois grupos quanto ao volume de ingestão hídrica diária ($21,3 \pm 3,6$ ml/100 g de peso/dia no grupo controle e, $24,4 \pm 6,8$ ml/100 g de peso/dia no grupo tratado com enalapril), assim como, no ganho ponderal dos animais ($57,9 \pm 16,7$ g no grupo controle e, $53,4 \pm 11,4$ g no grupo tratado com enalapril).

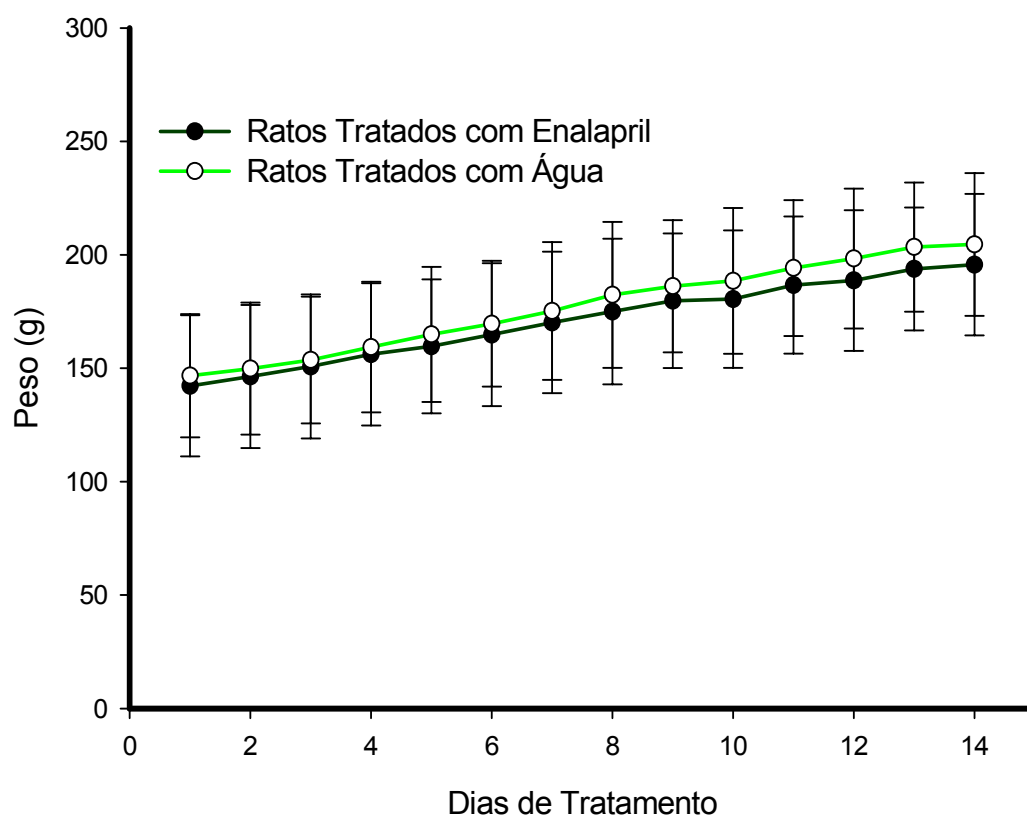


Figura 3.1: Avaliação do ganho ponderal de 12 ratos tratados durante um período de 14 dias com solução de enalapril a 5% por via oral e comparados a 12 ratos controle.

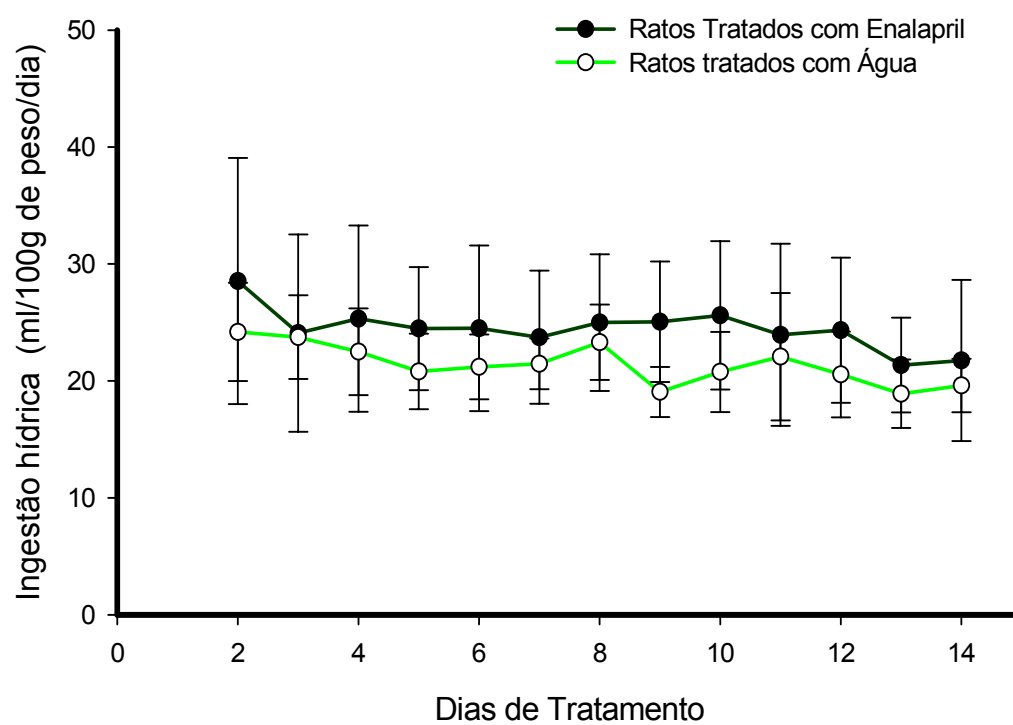


Figura 3.2: Avaliação da ingestão de líquidos de 12 ratos tratados durante um período de 14 dias com solução de enalapril a 5% por via oral e 12 ratos controle. Valores expressos em ml/100 g de peso corporal/dia de tratamento.

3.5 - Colheita de Sangue

Dois dias antes dos experimentos foi implantado um cateter de silastic (0,5mm DI, 0,94mm DE, N°602-135, Down Corning, USA) no átrio direito dos ratos, através da veia jugular externa (HARMS & OJEDA, 1974). Este cateter para coleta de sangue foi exposto no dorso e preenchido com solução salina fisiológica. No dia do experimento, após limpeza com salina fisiológica, foi adaptada uma conexão de polietileno P50, preenchida com salina fisiológica, medindo 40 cm, ao cateter atrial.

Após uma hora de adaptação uma amostra basal foi colhida e em seguida foi realizado o estresse neurocitoglicopênico com infusão de 2DG pelo cateter atrial, seguindo-se novas coletas de 0,6 ml aos 5, 10, 20, 30 e 60 minutos.

Cada amostra foi de 0,6 ml e segundo o cálculo de volume sanguíneo em ratos descrito por Lee & Blaufox (1985), este volume não apresenta efeito hemodinâmico significativo.

As amostras foram colhidas por seringas com citrato de sódio e mantidas em gelo até a centrifugação (900 G, 20 minutos) à temperatura de 4°C. O plasma foi separado e estocado a -20°C para análises bioquímicas posteriores.

3.6 - Estresse Neurocitoglicopênico por 2-Deoxi-D-Glicose (2DG)

O estresse neurocitoglicopênico foi realizado utilizando-se a 2-deoxi-D-glicose, um inibidor competitivo da glicose, na dose de 50mg/100g de peso de animal sob forma de solução a 10% (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA Jr et al., 1999). A droga foi injetada imediatamente após colheita de amostra basal, por infusão venosa lenta, através do cateter atrial. Como grupo experimental de controle foram utilizados ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos à infusão de solução salina (NaCl 0,15M), com colheitas de sangue obedecendo ao mesmo protocolo.

3.7 - Grupos Experimentais

Os animais foram assim distribuídos em três grupos experimentais:

- Grupo CD: ratos tratados cronicamente com veículo e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico;
- Grupo ED: ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico;
- Grupo ES: ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos à infusão salina;

3.8 - Métodos de Análise Química

3.8.1 - Determinação da Glicose Plasmática

A glicose plasmática foi determinada pelo método de glicose-oxidase (GOD-ANA, CENTERLAB, Brasil), utilizando-se amostras em duplicatas.

3.8.2 – Determinação do Triglicerídeo Plasmático

O triglicerídeo plasmático dos animais foi determinado pelo método enzimático (GPO-ANA, CENTERLAB, Brasil), utilizando-se amostras em duplicatas.

3.8.3 - Determinação do Colesterol Plasmático

O colesterol plasmático dos animais foi determinado pelo método enzimático (CENTERLAB, Brasil), utilizando-se amostras em duplicatas.

3.8.4 - Determinação da Insulina Plasmática

A insulina plasmática dos animais foi determinada através de kits de radioimunoensaio (SRI-13K, Linco Research, USA) contendo insulina marcada com ¹²⁵I e soro antiinsulina de rato como anticorpo do ensaio. Todas as amostras foram dosadas em conjunto, em duplicatas e realizadas no

Laboratório de Fisiologia Endócrina, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Faculdade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) com coeficientes de variação intraensaio de 11%.

3.9 - Tratamento estatístico dos resultados

As amostras obtidas antes e após o estresse neurocitoglicopênico foram comparadas pelo teste t. Student pareado. As diferenças entre os grupos foram determinadas utilizando-se a análise de variância (one way) pelo método de Holm Sidak. A integração das áreas sob as curvas das diversas variáveis foi realizada pela regra do trapézio. $P < 0,05$ foi tomado como índice de significância.

3.10 – Aprovação em Comitê de Ética

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG).

4.0 - RESULTADOS

4.1 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre a glicose plasmática:

Os grupos de ratos tratados com enalapril não demonstraram níveis glicêmicos basais diferentes dos animais controle ($95,3 \pm 5,2$ mg/dl, CD; $98,6 \pm 6,4$ mg/dl, ED; $86,0 \pm 7,7$ mg/dl, ES; $p > 0,05$). Após a infusão de 2DG, ocorreu uma acentuada elevação dos níveis glicêmicos em ambos os grupos CD e ED, que foi significativo já aos cinco minutos ($p < 0,01$), com aumento progressivo e atingindo pico aos 30 minutos no grupo CD ($306,5 \pm 22,8$ mg/dl) e aos 60 minutos no grupo ED ($310,3 \pm 28,7$ mg/dl). Os níveis glicêmicos apresentados pelos grupos ED e CD após a infusão de 2DG foram significativamente diferentes ($p < 0,01$) em relação aos níveis glicêmicos apresentados pelo grupo ES.

Apesar do pico hiperglicêmico tardio no grupo de animais tratados com enalapril (ED), os dados referentes às áreas sob as curvas (Figura 4.2) não mostraram diferença entre este grupo e o controle (CD). Após a infusão de salina não houve qualquer mudança significativa nos níveis glicose plasmática.

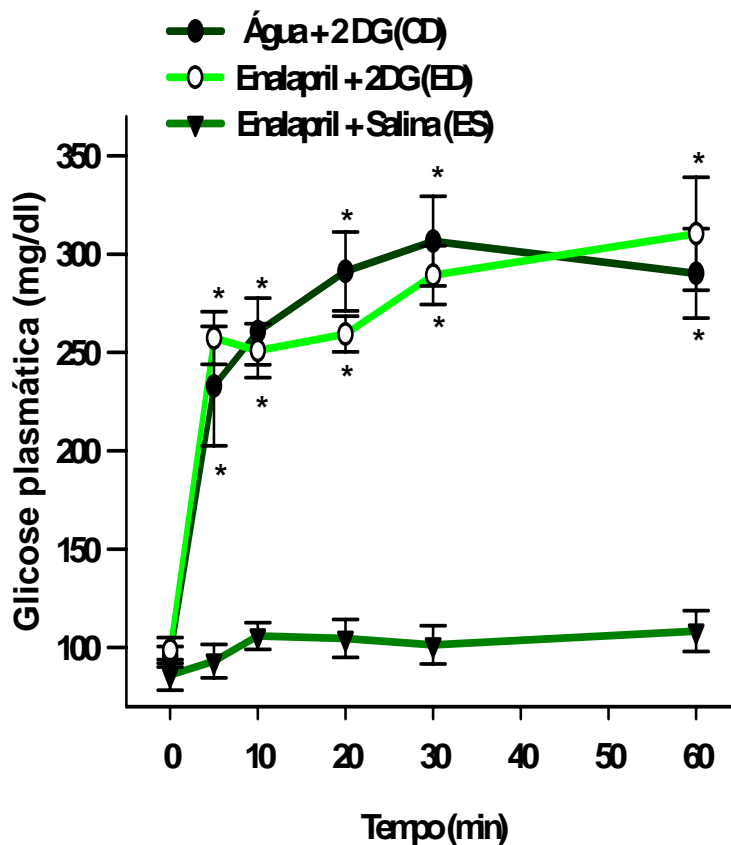


Figura 4.1: Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de glicemia plasmática (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril. Os valores representam a média +/- EPM das observações individuais de cada um dos grupos: CD (10 ratos tratados cronicamente com veículo e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ED (10 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ES (07 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos à infusão salina).

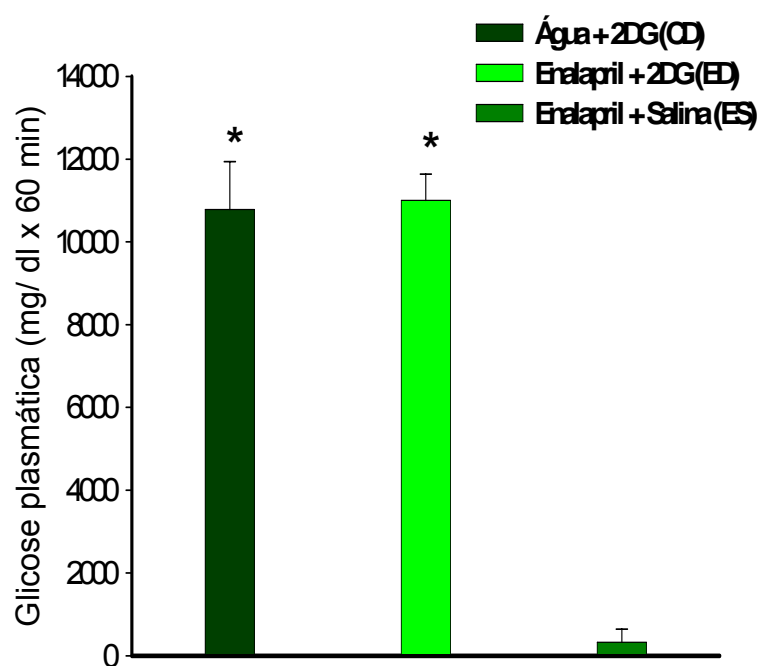


Figura 4.2: Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de glicemia (mostrado na figura 4.1). Os valores representam as médias +/- EPM das áreas individuais. ES com $p < 0,05$ em relação a CD e ED.

4.2 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre a insulina plasmática:

Os grupos de ratos tratados com enalapril não demonstraram valores de insulina plasmática basais significativamente diferentes dos animais controle ($0,22 \pm 0,06$ ng/ml, CD; $0,44 \pm 0,13$ ng/ml, ED; $0,15 \pm 0,05$ ng/ml, ES; $p > 0,05$). Após a infusão de 2DG, ocorreu uma rápida redução dos valores de insulina plasmática no grupo controle (CD), significativa aos 5 min ($p < 0,05$), seguindo-se de recuperação aos níveis dos valores basais. No grupo de animais tratados com enalapril (ED) ocorreu uma tendência, não significativa, à redução da insulina plasmática até aos 10 min, seguindo-se de significativa elevação, com pico aos 30 min ($1,13 \pm 0,26$ ng/ml), $p < 0,05$ em relação ao basal e $p < 0,05$ em relação a CD e ES. Após a infusão de salina (ES) não ocorreu qualquer alteração significativa sobre os valores de insulina plasmática.

A análise comparativa das áreas sob as curvas de insulina plasmática não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo ED e os animais controle submetidos ao estresse (CD). Foi observada uma diferença significativa entre os ratos tratados com enalapril, submetidos (ED) ou não (ES) ao estresse neurocitoglicopênico, $p < 0,05$.

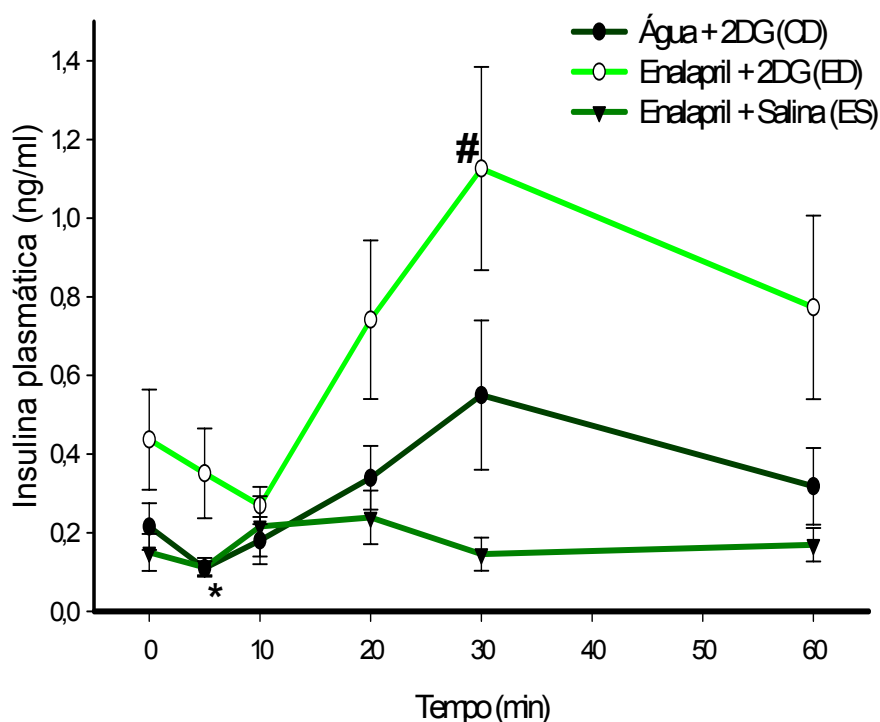


Figura 4.3: Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de insulina plasmática (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril. Os valores representam a média +/- EPM das observações individuais de cada um dos grupos: CD (10 ratos tratados cronicamente com veículo e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ED (10 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ES (07 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos à infusão salina). * $p < 0,05$ em relação aos níveis basais; # $p < 0,05$ em relação a CD e ES.

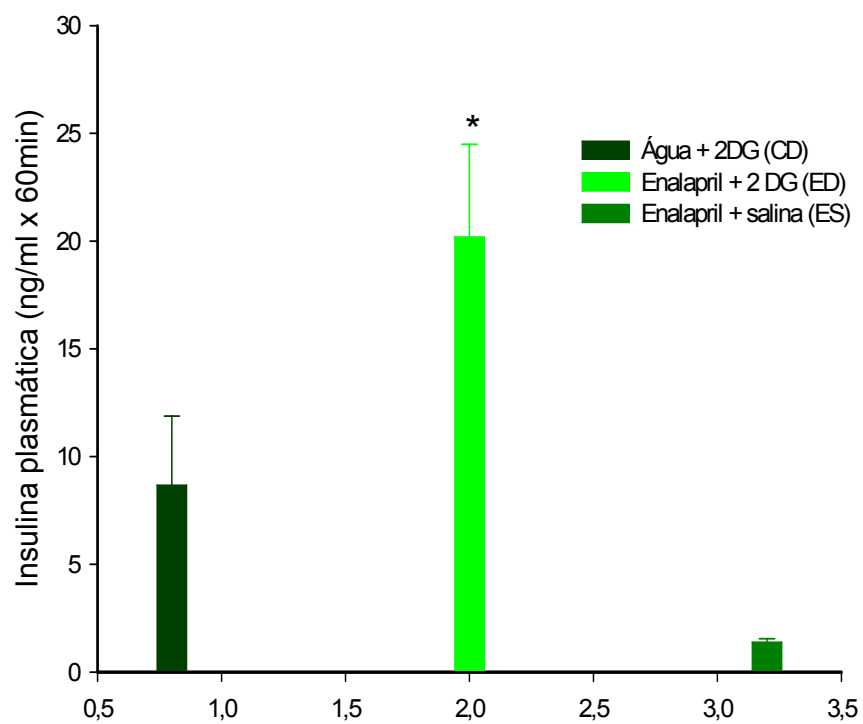


Figura 4.4: Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de insulina (mostrado na figura 4.3). Os valores representam as médias \pm EPM das áreas individuais. * ED com $p < 0,05$ em relação a ES.

4.3 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os triglicérides:

Os grupos de ratos tratados com enalapril não demonstraram valores de triglicérides plasmáticos basais diferentes dos animais controle ($25,3 \pm 4,7$ mg/dl, CD; $20,3 \pm 3,5$ mg/dl, ED; $24,4 \pm 5,3$ mg/dl, ES). Após a infusão de 2DG, ocorreu uma elevação dos níveis de triglicérides plasmáticos no grupo ED, com valor máximo aos dez minutos ($33,8 \pm 6,8$ mg/dl; $p < 0,05$ em relação ao basal), e que foi mantida durante todo o tempo de experimento (Figura 4.5). Ao contrário do grupo ED, os animais controle (CD) mostraram uma queda dos valores de triglicérides plasmáticos após a infusão de 2DG, significativa já aos dez minutos ($p < 0,05$) e com nadir aos vinte minutos ($15,9 \pm 2,2$ mg/dl). O grupo de animais tratados com enalapril e não submetidos ao estresse neurocitoglicopênico (ES) também demonstrou uma queda dos valores dos triglicérides durante o tempo de observação do estudo, sendo significativa a diferença em relação ao basal aos trinta minutos ($18,4 \pm 3,4$ mg/dl; $p < 0,05$).

A análise comparativa das áreas sob as curvas de valores de triglicérides plasmáticos (Figura 4.6) mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo ED e os demais grupos (CD e ES $p < 0,05$).

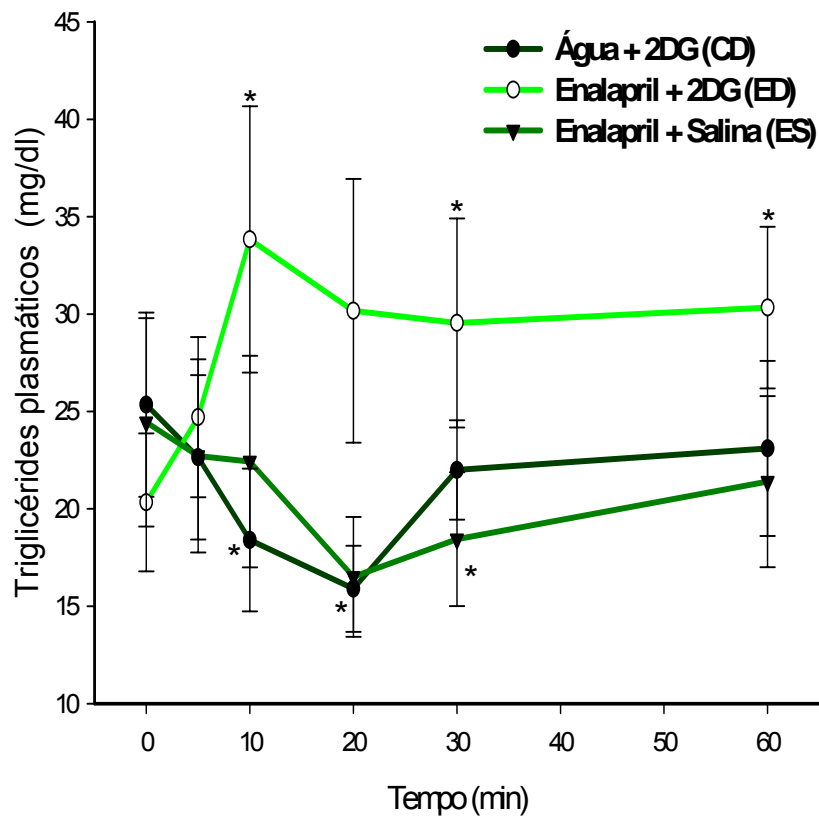


Figura 4.5: Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de triglicérides plasmáticos (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril. Os valores representam a média +/- EPM das observações individuais de cada um dos grupos: CD (10 ratos tratados cronicamente com veículo e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ED (12 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ES (07 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos à infusão salina. * $p < 0,05$ em relação aos níveis basais.

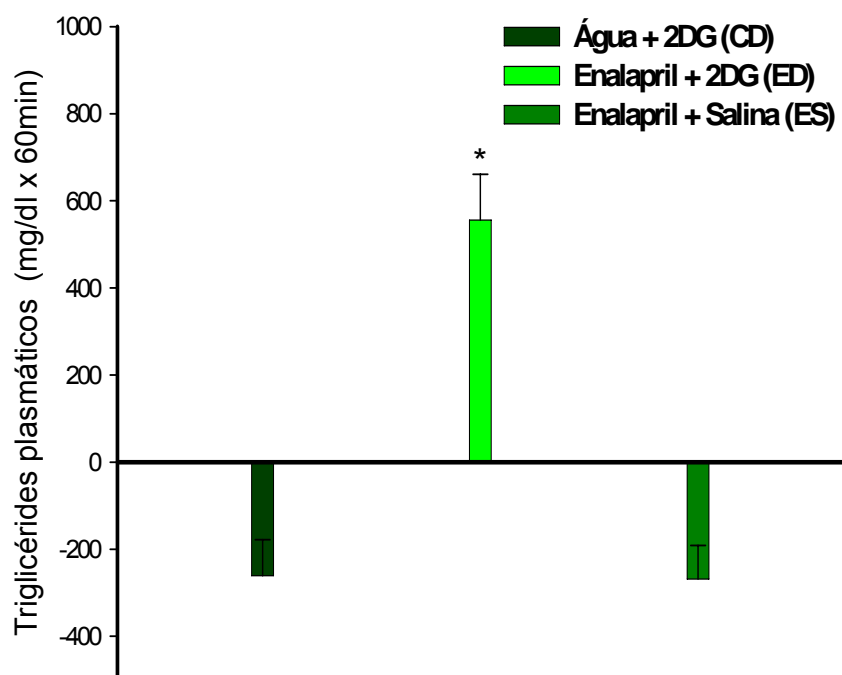


Figura 4.6: Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de triglicerídeos plasmáticos (mostrado na figura 4.5). Os valores representam as médias \pm EPM das áreas individuais. * $p < 0,05$ em relação a CD e ES.

4.4 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis plasmáticos de colesterol:

Após a infusão de 2DG, não foi observada qualquer alteração sobre os níveis de plasmáticos de colesterol. Os valores absolutos de colesterol plasmático dos três grupos estudados (CD, ED, ES) não mostraram diferença significativa durante todo o tempo de experimento (Figura 4.7).

A análise das áreas integradas sob as curvas dos valores de colesterol plasmático não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 4.8).

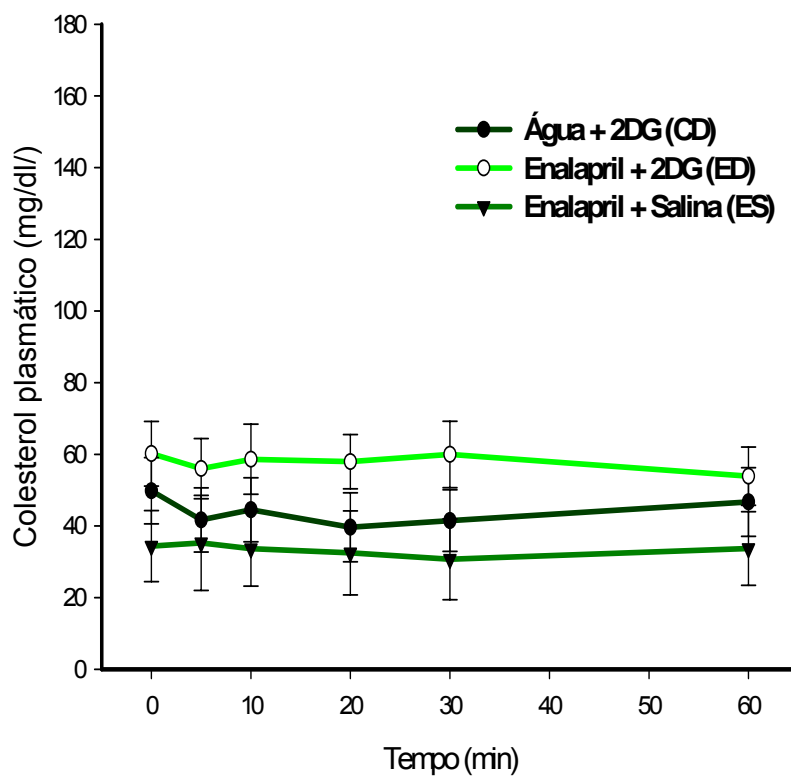


Figura 4.7: Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre os níveis de colesterol plasmático (valores absolutos) de ratos tratados cronicamente com enalapril. Os valores representam a média + EPM das observações individuais de cada um dos grupos: CD (10 ratos tratados cronicamente com veículo e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ED (12 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos ao estresse neurocitoglicopênico); ES (07 ratos tratados cronicamente com enalapril e submetidos à infusão salina).

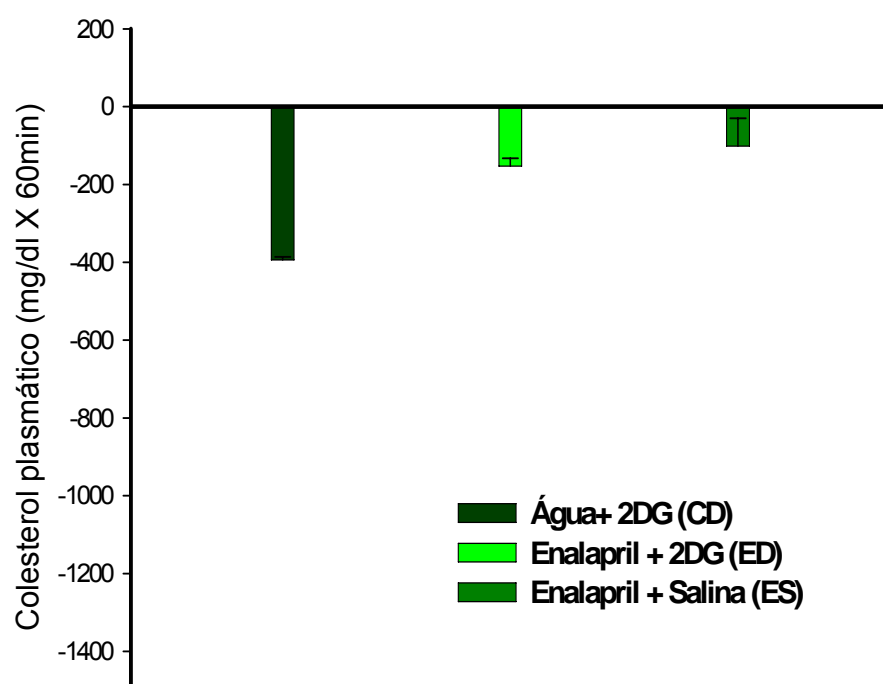


Figura 4.8: Representação gráfica das áreas integradas sob as curvas de colesterol plasmático (mostrado na figura 4.7). Os valores representam as médias + EPM das áreas individuais. ED x CD x ES; NS.

5.0 - DISCUSSÃO

5.1 - Tratamento crônico com inibidor da enzima conversora de angiotensina (Enalapril)

No experimento apresentado, o tratamento crônico com inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA), enalapril, não causou alteração nos valores basais dos parâmetros metabólicos que foram observados nos ratos estudados. Os valores basais de glicemia, insulina plasmática, triglicérides e colesterol plasmáticos não se mostraram diferentes dos animais controle. Este modelo de tratamento foi descrito anteriormente por Britto *et al.* (1997), quando foi observado que a dose de 10 mg / kg de peso por dia era efetiva em bloquear a ação sistêmica e, possivelmente central, da ECA. O experimento demonstrou ainda que este tratamento não causava efeitos cardiovasculares mensuráveis pelas técnicas utilizadas, em especial sobre pressão arterial.

O presente estudo demonstrou também, que o tratamento crônico com IECA não alterou o volume de ingestão hídrica e o ganho ponderal dos animais tratados quando comparados com os animais controle. Estes dados são importantes, uma vez que a Angiotensina II (Ang II) possui um conhecido efeito dipsogênico quando administrada por via intracerebrovascular (FITZSIMONS, 1975).

Além da redução da produção de Ang II, parte dos efeitos dos IECA é creditada a elevação dos níveis de bradicinina e Ang 1-7 (SANTOS, 2001; TOM, 2003).

No sistema cardiovascular, a Ang 1-7 atua como um antagonista das ações da Ang II e o bloqueio da ECA elevam seus níveis circulantes a níveis próximos aos da Ang II (SANTOS, 2001). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos da Ang 1-7 no metabolismo de carboidratos e lipídios. Já a bradicinina apresenta efeitos conhecidos sobre o metabolismo glicêmico, atuando sobre a ação periférica da insulina, facilitando a captação de glicose insulino-induzida principalmente em situações de resistência à insulina (HENRIKSEN, 1999). Em especial, Beard *et al* (2006) mostraram que a bradicinina aumenta a captação de glicose insulino-induzida por aumentar o óxido nítrico endotelial e melhorar as vias sinalização pós-receptor de insulina. Somando-se a estes dados, várias evidências vêm se acumulando sobre a participação da Ang II no metabolismo glicêmico (MCFARLANE, 2003; ENGELI, 2003). De forma geral, o bloqueio crônico da ECA, aparentemente, induz a um estado de maior sensibilidade à insulina (McFARLANE, 2003).

Dendorfer *et al.* (1998) ressaltam também a interação do RAS com o Sistema Nervoso Simpático (SNS). Apesar de seus estudos falharem em demonstrar uma alteração das concentrações de dopamina, adrenalina e noradrenalina após um curso de 14 dias de tratamento com IECA, foi demonstrado que a bradicinina aumenta a secreção induzida de noradrenalina. Com base nestes estudos podemos concluir que o uso crônico de IECA pode interferir na resposta aguda da noradrenalina, devido a uma maior concentração circulante de bradicinina.

5.2 - Efeitos do estresse neurocitoglicopênico sobre a glicemia e, insulina, triglicérides e colesterol plasmáticos de ratos tratados cronicamente com enalapril

O tratamento crônico com enalapril utilizado no presente estudo alterou a resposta metabólica ao estresse neurocitoglicopênico pela 2DG. Os dados apresentados mostraram que ocorreu uma diferença significativa na resposta da insulina plasmática e, sobretudo, nos triglicérides plasmáticos. Contudo, a resposta hiperglicêmica não foi alterada pelo tratamento com enalapril, assim como não se observou diferença nos valores de colesterol plasmático.

A aplicação de um estímulo estressor a um indivíduo ativa mecanismos complexos de adaptação às mudanças do meio ambiente. Esta resposta adaptadora é obtida principalmente através de mecanismos neuroendócrinos, autonômicos e comportamentais. Participam destes ajustes o estímulo à produção hepática de glicose e a inibição da secreção de insulina que respondem de maneira peculiar ao estresse neurocitoglicopênico pela infusão de 2 deoxi-D-glicose (2DG). O estado de glicoprivação é reconhecido pelo sistema nervoso central (SNC) que integra as informações e mobiliza respostas proporcionais à intensidade deste estímulo estressor (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 1997). A ativação da resposta a este estímulo estressor acarreta também um aumento na secreção de glucagon e cortisol, mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo e redução dos triglicérides plasmáticos (CHAIT, 1979). A neurocitoglicopenia induzida pela 2DG aumenta tanto o tônus parassimpático quanto o tônus simpático, com um efeito predominante do tônus simpático

responsável pelos maiores efeitos sobre a hiperglicemia plasmática e inibição da secreção de insulina (YAMAMOTO, 1988; HAVEL, 1989; TAKAHASHI, 1994).

Após a infusão de 2DG, ambos os grupos submetidos ao estresse, tratados com enalapril (ED) e ratos controle (CD) mostraram uma resposta hiperglicêmica expressiva. Esta resposta era significativa já aos cinco minutos e atingiu os valores mais elevados aos 60 minutos no grupo ED e 30 minutos no grupo CD. Os resultados obtidos nos animais controle estão em acordo com os dados da literatura. Observa-se que a neurocitoglicopenia induzida pela infusão venosa de 2DG causa uma resposta hiperglicêmica de grande monta, principalmente devido ao estímulo simpático direto sobre o fígado (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 1997). Sabe-se também que a resposta hiperglicêmica à infusão de 2DG é dependente da concentração da droga utilizada no experimento, sendo mais intensa com doses mais elevadas (KARLSSON, 2002). A grande intensidade do estímulo induzido pela dose de 2DG utilizada neste estudo pode ser responsável pela equivalência dos resultados da resposta hiperglicêmica nos grupos experimentais, já que, a partir de certa intensidade de estímulo, o efeito do tratamento crônico com inibidor da ECA poderia ficar mascarado pelo estímulo estressor acentuado. No entanto, estiveram mantidos os padrões de resposta aguda hiperglicêmica peculiar ao estresse neurocitoglicopênico por 2-deoxi-D-glicose, corroborando com a dose descrita anteriormente por outros autores (YAMAMOTO, 1988; RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 1999).

Os estudos encontrados na literatura apontam para uma ação atenuadora da resposta hiperglicêmica ao estresse associada ao uso de antagonistas de receptores de angiotensina II (ARBs) (MACHADO, 1995; URESIN, 2004). Os estudos sobre o efeito do uso de IECA na resposta metabólica ao estresse são poucos. Corroborando com os dados anteriores, Bregonzio *et al.* (2004) e, Talas e Yurekli (2006) demonstraram que o tratamento com ARBs no primeiro e enalapril intra-peritoneal 10mg / kg de peso no segundo, impede o aumento da atividade da tirosina hidroxilase na medula supra-renal em ratos expostos ao estresse pelo frio. Este fato implicaria em uma redução dos efeitos metabólicos deste estresse.

Contudo, dados não publicados de nosso laboratório mostraram um incremento da resposta hiperglicêmica, sem alteração na resposta da insulina plasmática, ao estresse de imobilização em ratos Holtzman machos. Estes achados podem estar relacionados a uma maior atividade ou uma potenciação dos efeitos noradrenérgicos neste modelo de estresse. Uma das possíveis causas deste resultado seria devido a uma maior disponibilidade de bradicinina em decorrência do uso bloqueio crônico da ECA, uma vez que esse peptídeo possui um provável efeito potencializador da secreção de noradrenalina durante estímulos (DENDORFER, 1998). O mesmo estudo demonstrou também uma equivalência entre os grupos na resposta insulinêmica que, por sua vez, se justificaria pelo fato de a adrenalina ser a principal responsável pela supressão da insulina plasmática no estresse de imobilização.

Os dados obtidos no atual estudo demonstraram que a resposta insulinêmica ao estresse neurocitoglicopênico foi alterada pelo tratamento com enalapril. Após a infusão de 2DG, os ratos do grupo ED mostraram de forma atenuada e não significativa a esperada inibição inicial da secreção de insulina. Em contrapartida, no grupo CD observa-se uma rápida redução dos níveis de insulina plasmática, significativa aos cinco minutos. Esta inibição inicial se dá pela ação do SNS (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 1997). Em uma segunda fase, a partir dos 10 minutos, observamos uma elevação dos níveis de insulina plasmática com pico aos trinta minutos e significativamente maior nos ratos tratados com enalapril em relação aos demais grupos. De forma geral, o tratamento crônico com inibidor da enzima conversora de angiotensina atenuou a resposta simpática sobre a secreção de insulina, muito provavelmente potencializando a secreção de insulina glicose-induzida neste experimento.

O hipotálamo tem um importante papel em integrar a participação do SNC nas funções metabólicas reguladoras. Diversos estudos apontam para um importante efeito da neuroglicopenia induzida pela injeção de 2DG sobre o turnover e liberação de monoaminas (noradrenalina e dopamina) nos neurônios hipotalâmicos do núcleo paraventricular (PVN), do núcleo dorsomedial (DMN), do hipotálamo lateral (LH) e do núcleo ventromedial (VMH). Estas áreas hipotalâmicas, particularmente o VMH, LH e o PVN, estão envolvidas na regulação da glicose e dos níveis de insulina através da modulação simpática e parassimpática (SHIMAZU, 1987; PEINADO, 1987; SMYTHE, 1989; PACÁK, 2001). Sabemos também que a regulação da resposta ao estresse neurocitoglicopênico se dá diretamente por vias noradrenérgicas que

estimulam a liberação de glicose pelo fígado e indiretamente, inibindo a secreção pancreática de insulina, por meio da liberação de catecolaminas pela medula da glândula supra-renal (SMYTHE, 1989). O glucagon apresenta participação importante na resposta hiperglicêmica à infusão de 2DG (KALRSSON, 2002). Sua secreção é também regulada pelo SNA, por vias noradrenérgicas. Kalrsson *et al.* (2002) demonstraram ainda que a secreção de glucagon em resposta a neuroglicopenia é gênero-dependente, sendo mais intensa no sexo feminino.

A participação do RAS na resposta ao estresse é alvo de grande interesse em virtude da ampla utilização dos IECA e antagonistas do receptor AT_1 (ARBs) na prática clínica. Sabe-se que a infusão tanto periférica quanto intracerebro-ventricular de Ang II causa uma resposta hiperglicêmica que é mediada por receptores AT_1 na primeira (MACHADO, 1998) e, mediada por vias noradrenérgicas e principalmente pela secreção de adrenalina pela glândula supra-renal, na segunda (SINGH, 1977). As evidências acumuladas apontam para uma importante participação da Ang II via receptores AT_1 no estresse hemorrágico (MACHADO, 1995) e estresse de imobilização (URESIN, 2003; 2004). Yang *et al.* (1996) demonstraram que a Ang II encontra-se elevada em vários modelos de estresse em ratos, possivelmente devido ao aumento da atividade simpática renal, com conseqüente liberação de renina. No mesmo estudo, ressalta ainda a participação da Ang II nos eixos simpato-adrenal e hipotálamo-hipófise-adrenal. Neste último, ativando diretamente os neurônios produtores de CRH, estimulando indiretamente as células produtoras de ACTH pela ativação de neurônios vasopressinérgicos, e atuando diretamente nas

células produtoras de ACTH pelo RAS tecidual hipofisário, além da ativação da produção de glicocorticoides pela zona fasciculada das glândulas supra-renais. De importância, Leong *et al.* (2002) demonstraram que o estresse de imobilização de forma crônica e aguda modula a expressão de componentes do RAS no hipotálamo, na hipófise e nas glândulas supra-renais.

O RAS interage de várias formas na secreção e mecanismos de ação da insulina. É de conhecimento hoje, a existência de um RAS tecidual pancreático, atuando sobre suas funções endócrinas e exócrinas (LEUNG, 1999 e 2003). Carlsson *et al.* (1998) demonstraram que o uso de enalaprilato (metabólito ativo do enalapril) e de saralasin (antagonista de Ang II), aumenta o fluxo sanguíneo pancreático e de modo contrário, a infusão de Ang II reduz este fluxo, o que poderia afetar a primeira fase de secreção de insulina. Tomando-se em conta estes dados em associação com uma possível interferência sobre a atividade da tirosina hidroxilase, gerados pelo uso crônico de IECA, modificando assim a resposta do eixo simpato-adrenal, poderiam se justificar os dados referentes à secreção de insulina nos grupos experimentais do presente estudo.

No presente estudo, observamos que o perfil de resposta ao estresse neurocitoglicopênico dos triglicérides plasmáticos foi modificado de maneira significativa pelo tratamento crônico com enalapril. Nos ratos tratados com enalapril, após a infusão de 2DG, observou-se uma elevação dos níveis dos triglicérides que foi significativa já aos 10 minutos e mantida durante todo o período de experimento. Já no grupo controle, o estresse neurocitoglicopênico induziu a uma redução dos triglicérides plasmáticos, significativa aos dez

minutos. Estes dados apontam para uma ação importante do RAS sobre o metabolismo lipídico na resposta ao estresse neurocitoglicopênico. A resposta encontrada nos animais controle (grupo CD) foi semelhante à observada no grupo de animais tratados com enalapril e submetidos à infusão de salina (grupo ES). Apesar do padrão semelhante entre os grupos CD e ES, não podemos concluir que o estresse neurocitoglicopênico falhou em causar uma alteração no metabolismo dos triglicérides, uma vez que o grupo ES poderia sofrer interferência do uso crônico do inibidor de ECA assim como da infusão venosa de enalapril da dose de reforço (5 mg / Kg de peso), que foi administrada uma hora antes do experimento. O estresse neurocitoglicopênico pela 2DG, assim como o tratamento crônico com IECA não interferiu no perfil plasmático do colesterol que se mantiveram constantes durante todo o período de experimento.

Apesar de ainda controverso, existem estudos que sustentam o encontro de queda dos níveis de triglicérides durante o estresse (ROBERTSON, 1976; STAZECC, 1981; RICART-JANÉ 2002). A resposta ao estresse, através da elevação dos níveis plasmáticos de catecolaminas, ativa a lipase tecidual hormônio-sensível do tecido adiposo, levando a mobilização de triglicérides para o plasma. A degradação periférica dos triglicérides é realizado pela lipase lipoprotéica, que, atua sobre os triglicérides, liberando ácidos graxos livres na circulação. Esta enzima é produzida em vários tecidos e se encontra na forma ativa (dimérica) na membrana das células endoteliais. Durante o estresse sua atividade é, aparentemente, tecido-específica, sendo inibida no tecido adiposo e ativada no tecido muscular (RICART-JANÉ, 2005). Desta forma, o tecido

adiposo passa a exercer uma função de fornecedor de energia para os demais tecidos, em especial o tecido muscular que degrada triglicérides e capta ácidos graxos livres, utilizando-os como fonte de energia. Os dados deste estudo apontam para uma modificação na resposta metabólica periférica ao estresse neurocitoglicopênico induzida pelo bloqueio crônico da ECA. Esta interferência provavelmente aconteceu ao nível da atividade da lipase lipoprotéica, que teve agudamente a sua ação comprometida pelo tratamento utilizado no estudo. Esta hipótese poderia ser confirmada com a dosagem dos ácidos graxos livres, que esperaríamos encontrar níveis plasmáticos diminuídos nos animais do grupo ED, ao contrário da esperada elevação observada em estresses (RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, 1999; PACÁK, 2001; RICART-JANÉ, 2002).

6.0 – CONCLUSÕES

O uso crônico de enalapril na dose de 10mg/kg de peso por dia, não alterou os valores plasmáticos basais de glicose, insulina, triglicérides e colesterol.

O estresse neurocitoglicopênico induz uma resposta hiperglicêmica periférica marcante, significativa já aos 5 minutos. Esta resposta não é alterada pelo tratamento crônico com IECA (enalapril).

O tratamento crônico com enalapril alterou a resposta da insulina plasmática ao estresse neurocitoglicopênico atenuando a sua inibição inicial e exacerbando a secreção de insulina glicose-induzida.

A inibição crônica da atividade da enzima conversora de angiotensina com enalapril causa uma inversão no padrão da resposta metabólica dos triglicérides plasmáticos, induzindo a elevação de seus níveis durante o estresse neurocitoglicopênico. Estes dados sugerem a participação do sistema renina-angiotensina nas vias metabólicas de mobilização de lipídios durante o estresse agudo.

O uso crônico de enalapril não alterou o perfil do colesterol plasmático após a neurocitoglicopenia.

O tratamento crônico com enalapril possivelmente reduziu a resposta do SSA, o que pode ter influenciado na alteração do padrão de resposta da insulina plasmática.

Este estudo reforça a participação do sistema renina-angiotensina na resposta metabólica ao estresse agudo. Contudo, não podemos excluir a participação de outros sistemas que sofrem interferência pela inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina como o sistema cinina-caliceína.

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRÉN, B.; TABORSKY Jr, G.J.; PORT Jr, D.. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. **Diabetologia**. v.29, p.827-836, 1986.

ARAKAWA, K.; URATA H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. **Hypertension**, v.36 (4), p. 638-641, 2000.

BIALIK, R.J. *et al.* Adrenal demedullation blocks and brain norepinephrine depletion potentiates the hyperglycemic response to a variety of stressors. **Brain Research**. v. 502, p.88-98, 1989.

BEARD, K.M. *et al.* Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH₂-terminal kinase. **Diabetes**. v.55, p.2678-2687, 2006

BIGGERS, D.W. *et al.* Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs. **Diabetes**. v.38, p.7-16, 1989.

BREGONZIO, C. *et al.* Angiotensin II AT1 receptor blockade prevent gastric ulcer during cold-restraint stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1018, p.351-355, 2004.

BRITTO, R.R. *et al.* Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. **Hypertension**. v.30, part 2, p.549-556, 1997.

CAMPBELL, D.J. The rennin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol**. v.35, p.784-791, 2003.

CARLSSON, P.O.; BERNE, C.; JANSSON, L. Angiotensin II and the endocrine pancreas. **Diabetologia**. v. 41, p. 127-133, 1998.

CHAIT, A. *et al.* Reduction of plasma triglyceride concentration by acute stress in man. **Metabolism**. v.28(5), p.553-561, 1979.

CHOBANIAN *et al.* Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII). **Hypertension**. 42: 1206-1252. 2003.

CHROUSOS, G.P. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v.21, p. 833-858,1992.

CHROUSOS, G.P.. Stress as a Medical and Scientific Idea and Its Implications. **Advances in Pharmacology**. v.42, p.552-556, 1998.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W.. The concept of stress and stress system disorders. **JAMA**. v.267, No.9, p.1244-1252, 1992.

COIMBRA, C.C.; GROSS, J.L.; MIGLIORINI, R.H.. Intraventricular 2-deoxyglucose, glucose, insulin, and free fatty acid mobilization. **Am. J. Physiol.** v.236, p.E317-E322, 1979.

COIMBRA, C.C.; MIGLIORINI, R.H.. Evidence for a longitudinal pathway in rat hypothalamus that controls FFA mobilization. **Am. J. Physiol.** v.245, p.E332-E337, 1983.

CRYER, P.E. Hypoglycemia: The limiting factor in the management of IDDM. . **Diabetes**. v.43, p.1378-1389, 1994.

DEMAREST, K.T.; MOORE K.E.; RIEGLE, G.D. Acute restraint stress decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity : evidence for a differential response in male versus female rats. **Neuroendocrinology**. v.41, p. 504-510, 1985.

DENDORFER, A. *et al.* Interactions between the rennin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. **Basic Res Cardiol**. v.93(2), p.24-29, 1998.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS G.P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends Endocrinol. Metab**. v.10, p. 359-368, 1999.

ELENKOV, I.J. *et al.* Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 876, p. 1-11, 1999.

ENGELI, S. *et al.* The adipose-tissue rennin-angiotensin-aldosterone system: role in metabolic syndrome?. **Int J Biochem Cell Biol**. v.35, p.807-825, 2003.

FANG, T.; HUANG, W. Angiotensin receptor blockade blunts hyperinsulinemia-induced hypertension in rats. **Hypertension**. v.32, p.235-242, 1998.

FITZSIMONS, J.T. The renin-angiotensin system and drinking behavior. **Prog. Brain Res.**, v. 42, p. 215-33, 1975.

GOODFRIEND, T.L.; ELLIOT, M.E.; GATT, K.J. Angiotensin receptors and their antagonists. **N Engl J Med**, v. 334 (25), p. 1649-1654, 1996.

HABIB K.E. *et al.* Oral Administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 97, p. 6079-6084, 2000.

HANSON, 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) randomized trial. **Lancet**. V353, p.611-616,1999.

HARMS, P.G.; OJEDA S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J. Appl. Physiol**. v.36, p. 391-392, 1974.

HAVEL, P.J.; TABORSKY Jr, G.J. The contribution of the autonomic nervous system to changes of glucagon and insulin secretion during hypoglycemic stress. **Endocrine Reviews**. v.10 (3), p.332-350, 1989.

HENRIKSEN, E.J.; JACOB. S. Effects of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. **Metabolism**, v.44, p.267-272, 1995.

HENRIKSEN, E.J. *et al.* ACE inhibition and glucose transport in insulin resistant muscle: roles of Bradykinin and nitric oxide. **Am. J. Physiol**. v. 277, R332 – R336, 1999.

HOLTZ, J.; GOETZ R. M. Vascular rennin-angiotensin-system, endothelial function and atherosclerosis ? **Basic Res. Cardiol**. 89 (supl 1), p. 71-86, 1994.

JAN DANSER, A.H. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. **Int J Biochem Cell Biol**. v.35, p.759-768,2003.

KARLSSON, S.; SCHEURINK, A.J.W.; AHREN, B. Gender difference in the glucagon response to glucopenic stress in mice. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. v.282, p.R281–R288, 2002.

KEIDAR, S. Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. **Life Sci**, v. 63 (1), p.1-11, 1998.

LEE,H.B.; BLAUFOX,M.D.. Blood volume in the rat. **J. Nucl. Méd**. v.25, p.72-76, 1985.

LEONG, D.S. *et al.* Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensina II AT1a, AT1b and AT2 receptors. **Neuroendocrinology**. v.75, p.227-240, 2002.

LEUNG, P.S. *et al.* Expression and localization of rennin-angiotensin system in the rat pancreas. **Journal of Endocrinology**. v.160, p.13-19, 1999.

LEUNG, P.S.; CHAPPELL, M.C. A local pancreatic renin-angiotensin systems: endocrine and exocrine roles. **Int J Biochem Cell Biol**, v.35, p.838-846, 2003.

LINDHOLM, L.H. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. **Lancet**, v.359, p.1004-1010, 2002.

LOON, E. *et al.* Effects of ramipril and vitamin E on hematological markers of fibrinolysis, coagulation and endothelial function: results of the MORE HOPE study. **Can. J. Cardiol.** v. 16 (supl. F), p. 233F, 2000.

MACHADO, L.J.C. *et al.* Hyperglycemic action of angiotensin II in freely moving rats. **Peptides.** v.16, p.476-483, 1995.

MACHADO, L.J.C. *et al.* The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.31, p.1349-1352, 1998.

McFARLANE, S.L.; KUMAR, A.; SOWERS, J.R. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. **Am J Cardiol.** v.91, p.30H-37H, 2003.

McKINLEY, M.J. *et al.* The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **Int J Biochem Cell Biol.** v.35, p.901-918,2003.

ODIO, M.R.; MAICKEL, R.P.. Comparative biochemical responses of rats to different stressful stimuli. **Endocrinology.** v.117, p.307-314, 1985.

PACAK, K. *et al.* Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. **Am. J. Physiol.** v. 275, p. 1247-1255, 1998.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of neuroendocrine responses: implication for stress-related disorders. **Endocrine Reviews.** v.22(4), p502-548, 2001.

PAUL, M.; MEHR, A.P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v.86, p.747 – 803, 2006.

PEINADO, J.M.; MYERS, R.D. Norepinephrine release from PVN and lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in sated and fasted rat. **Pharmacol Biochem Behav.** v.27, p. 715-721, 1987.

REIS, F.M. *et al.* Blood glucose and prolactin in hyperprolactinemic rats exposed to restrain and surgical stress. **Life Sciences**, v.58, n 2, p.155-161, 1996.

REIS, F.M. *et al.* Mini review article: plasma prolactin and glucose alterations induced by surgical stress: a single or dual response.? **Experimental Physiology**, v. 83, p.1-10, 1998.

RIBEIRO-DE-OLIVEIRA Jr, A. Avaliação da resposta ao estresse neurocitoglicopênico e perfil endócrino-metabólico de animais tratados cronicamente com bromocriptina. Tese de doutoramento, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 1997.

RIBEIRO-DE-OLIVEIRA Jr, A. *et al.* Effects of chronic bromocriptine (CB-154) treatment on the plasma glucose and insulin secretion response to neurocytoglucopenia in rats. **Journal of Endocrinology**. v.162, p. 237-242, 1999.

RIBEIRO-DE-OLIVEIRA, A.JR. *et al.* Bromocriptine-induced dissociation of hyperglycemia and prolactin response to restraint. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 68, p.229-233, 2001.

RICART-JANÉ, D. *et al.* Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulation lipoproteins in rat. **Metabolism**. v. 51, p. 925-931, 2002.

RICART-JANÉ, D. *et al.* Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. **J Appl Physiol**. v. 99, p. 1343-1351, 2005.

ROBERTSON, R.P.; SMITH, P.H. Stress-induced inhibition of triacylglyceride secretion in vivo in sand rats (*Psammomys obesus*). **Metabolism**. v.25, p.1583-1590, 1976.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney blood vessels. **Hypertension**. v.38(2), p.660-664, 2001.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci**. v.100 (14), p.8258-8263, 2003. (A)

SANTOS, R.A.S. *et al.* Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7), **Hypertension**. v.41, p.737-743, 2003. (B)

SELYE H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32-36, 1936.

SHIMAZU, T. Neuronal regulation of hepatic glucose metabolism in mammals. **Diab Metab Rev**.v.3, p185-206, 1987.

SIMÕES E SILVA, A.C. *et al.* The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of angiotensin-(1-7) in essential hypertension. **J Pediatr**. V.145, p.93-98, 2004.

SIMÕES E SILVA, A.C. *et al.* The therapeutic potential of angiotensin-(1-7) as a novel renin-angiotensin system mediator. **Mini Rev Med Chem**. v.6 (5), p.603-9, 2006.

SINGH, K. N; AGARWAL, S; CHANDRA, V. Hyperglycemic Effect of Angiotensin. **Ind. J. Pharmac**. v.9, p.286-289, 1977.

SINGH, B.M.; METHA, J.L. Interactions between the rennin-angiotensin system and dyslipidemias: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. **Arch Intern Med**. v.163, p.1296-1304, 2003.

SMYTHE, G.A. *et al.* Relationships between brain noradrenergic activity and blood glucose. **Nature**. v.308, p.65-67. 1984.

SMYTHE, G.A.; PASCOE, W.S.; STOLIEN, L.H. Hypothalamic noradrenergic and sympathoadrenal control of glycemia after stress. **Am. J. Physiol.** v.256, p.E231-E235, 1989.

STARZEC, J.J. *et al.* The effects of differential psychological stress and infantile handling on plasma triglyceride and aortic cholesterol in rats. **Psychosom Med.** v.6, p.509-518, 1981.

STERNBERG, E.M.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; GOLD, P.W. The stress response and the regulation of inflammatory disease. **Annals of Internal Medicine**. v.117 (10), p.854-866, 1992.

STREHLOW, K. *et al.* Angiotensin AT1 receptor over-expression in hypercholesterolemia. **Ann. Med.**, v.32 (6), p.386-389, 2000.

TABORSKY Jr, G.J.; AHRÉN, B.; HAVEL, P.J. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia. Implications for impaired α -cell responses in type 1 diabetes. **Diabetes**. v.47, p.995-1005, 1998.

TAKAHASHI, A. *et al.* Hypothalamic cholinergic and noradrenergic neurons in hyperglycemia induced by 2-deoxyglucose. **Brain Res**. v.664, p.13-17, 1994.

TANAKA, K. *et al.* Modulation of arginine-induced insulin and glucagon secretion by the hepatic vagus nerve in the rat: effects of celiac vagotomy and administration of atropine. **Endocrinology**. v.127, p.2017-2023, 1990.

TALAS, Z. S.; YUREKLI, M. The effects of enalapril maleate and cold stress exposure on tyrosine hydroxylase activity in some rat tissues. **Cell Biochem Funct**. v.24(6), p.537-40, 2006.

THOMAS, W.G.; MENDELSON, F.A.O. Angiotensin receptors: form and function and distribution. **Int J Biochem Cell Biol**. v.35, p.774-779, 2003.

TOM, B.; DENDORFER, A.; JAN DANSER, A.H. Bradykinin, angiotensin(1-7), and ace inhibitors: how do they interact?. **Int J Biochem Cell Biol**. v.35, p.792-801, 2003.

TORLONE E. *et al.* ACE- inhibition increases hepatic and extra hepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension. **Diabetologia**. v.34, p.119-125, 1991.

TOWLER, D.A. *et al.* Mechanism of awareness of hypoglycemia. **Diabetes**. v.42, p.1791-1798, 1993.

UDELSMAN, R. *et al.* Responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal and renin-angiotensin axis and the sympathetic system during controlled surgical

anesthetic stress. **J. of Clin.Endocrinol and Metabol.** v.64, No5, p.986-994, 1987.

URESIN, A.Y.; TONYALI, H.; KARAMURSEL, S. The effect of losartan and immobilization stress on heart rate variability and plasma corticosterone levels in rats. **Intern. J. Neuroscience.** v. 114, p. 365-379, 2003.

URESIN, A.Y.; ERBAS, B.; OZEK, M. Losartan may prevent elevation of plasma glucose induced by chronic stress. **Polish Journal of Pharmacology,** v. 56, p. 271-273, 2004.

URESIN, A.Y. *et al.* Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** v.5 (2), p93-96, 2004.

YAMAMOTO, H.; NAGAL.K.; NAKAGAVA, H. Time-dependent involvement of autonomic nervous system in hyperglycemia due to 2-deoxy-D-glucose. . **Am. J. Physiol.** v.255, p.E928-E993. 1988.

YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y. Angiotensin II – an important stress hormone. **Biol Signals** v.5, p.1-8, 1996.

YUSUF, S. *et al.* Ramipril and the Development of Diabetes. **JAMA.** v.286 (15), p. 1882-1885, 2001.

WELCH, W.L. *et al.* Effect of adrenalectomy on renin release in the rat. **Endocrinology.** v.113, No 6, p.2086-2091, 1983.

APÊNDICE A

**Certificado de aprovação do estudo no Comitê de Ética em
Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**