

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANDRÉA SANCHES

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NOS  
EFEITOS METABÓLICOS E CARDIOVASCULARES INDUZIDOS POR  
ESTRESSE CRÔNICO EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada a  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
da UNICAMP, para obtenção do título de  
Mestre em Odontologia, na Área de  
Concentração em Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha  
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Este exemplar corresponde à versão  
final da Dissertação defendida pela  
aluna, e orientada pela Profa. Dra.

Tatiana de Sousa da Cunha

  
Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Sa55p

Sanches, Andréa, 1983-

Participação do sistema renina-angiotensina nos efeitos metabólicos e cardiovasculares induzidos por estresse crônico em ratos / Andrea Sanches. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Tatiana de Sousa da Cunha.

Coorientador: Fernanda Klein Marcondes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Angiotensina II. 2. Losartan. 3. Catecolaminas. 4. Enzima conversora de angiotensina. I. Cunha, Tatiana de Sousa da. II. Marcondes, Fernanda Klein, 1970- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Role of the renin-angiotensin system on cardiovascular and metabolic effects induced by chronic stress in rats

**Palavras-chave em Inglês:**

Angiotensin II

Losartan

Catecholamines

Angiotensin converting enzyme

**Área de concentração:** Fisiologia Oral

**Titulação:** Mestre em Odontologia

**Banca examinadora:**

Tatiana de Sousa da Cunha [Orientador]

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Danielle Yuri Arita

**Data da defesa:** 23-02-2012

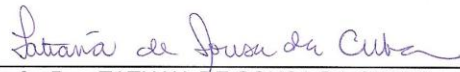
**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata ANDRÉA SANCHES aprovada.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. TATIANA DE SOUSA DA CUNHA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ELENICE APARECIDA DE MORAES FERRARI

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. DANIELLE YURI ARITA

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho,

Aos meus pais Angelo e Lourdes e minhas queridas irmãs, Aline e Luana, pelo incentivo, apoio e ajuda durante todos os momentos.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha querida orientadora Tatiana de Sousa da Cunha pelo ensino, ajuda e motivação. Obrigada pela oportunidade e confiança. Obrigada pela compreensão. Obrigada por me mostrar que só os fortes sobrevivem. Obrigada por ser um ótimo exemplo de caráter e competência em minha vida! Saiba que tenho uma grande admiração por ti!!! “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina...” – Cora Coralina.

À minha querida co-orientadora Fernanda Klein Marcondes que mesmo sem me conhecer, me aceitou em seu laboratório e me deu a oportunidade de realizar esse grande sonho. Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo de persistência e competência.

Às minhas queridas amigas que conheci no laboratório, mas que ficarão para toda a vida: Patrícia Oliveira de Lima e Rafaela Costa: obrigada pela ajuda diária e apoio para a realização desse trabalho. Obrigada pelo companheirismo e amizade. Saibam que serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

Ao meu querido namorado Renato Tegon Forti, pela admirável compreensão, carinho e paciência mesmo durante os momentos mais difíceis. Obrigada pela cumplicidade. Obrigada pelo companheirismo durante os estudos aos domingos. Obrigada por fazer parte de minha vida!

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por oferecer uma excelente qualidade de ensino e infra-estrutura para a realização desse trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedendo minha bolsa de estudos.

À Eliete Riguetto, secretária do Departamento de Ciências Fisiológicas e Elisa, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao Feliciano e Waldomiro, técnicos dos laboratórios de Fisiologia e Bioquímica, respectivamente. Obrigada pelo grande auxílio.

Aos meus colegas de laboratório Larissa, Nádia, Cristina, Monaliza, Vinicius e Vander pela companhia e ajuda.

À professora Cíntia P. M. Tabchoury, coordenadora do Programa de Pós Graduação em Odontologia. Obrigada pelo ótimo exemplo a ser seguido. Obrigada pela atenção, simpatia, dicas e por ser sempre receptiva nos momentos que mais precisei.

À professora Cristina e Juliana, participantes de minha banca de qualificação. Obrigada pelas correções e sugestões para a complementação desse trabalho.

À minha querida amiga Suelen, pelo apoio e ajuda para a realização desse sonho.

Ao meu querido cunhado Marco Antônio, pela ajuda e motivação.

À Vanessa, que mesmo sem me conhecer me hospedou em sua casa, contribuindo para a realização de parte das dosagens desse trabalho.

À professora Dulce Elena Casarini, por possibilitar que parte da realização desse trabalho fosse concretizada.

À equipe do Laboratório de Rins e Hormônios da UNIFESP. Obrigada pela recepção e colaboração.

À querida professora Ana Paula Tanno, motivo da minha grande inspiração e paixão pela Fisiologia.

À querida professora Júlia Raquel Negri. Saiba que nunca me esquecerei de todo seu otimismo, apoio e motivação para a realização desse estudo.

## EPÍGRAFE

"Não há garantia de que o universo se resigna às nossas predisposições. Mas não vejo como poderemos tratar com o universo - tanto o universo exterior como o interior - sem estudá-lo. A melhor maneira de evitar abusos é que a população em geral seja cientificamente educada, para compreender as implicações de tais investigações. Em troca da liberdade de investigação, os cientistas estão obrigados a explicar seus trabalhos. Se a ciência é considerada um sacerdócio fechado, muito difícil e elitista para a compreensão da pessoa média, os perigos de abuso são maiores. Mas se a ciência é um tópico de interesse e preocupação geral - se tanto suas coisas boas como suas consequências sociais forem discutidas regularmente e competentemente nas escolas, na imprensa, e nas mesas familiares - teremos aumentado enormemente nossas possibilidades de entender como é realmente o mundo, e como melhorar a ele e a nós mesmos."

Carl Sagan



## RESUMO

O estresse crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão, aterosclerose e diabetes. O protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) é um modelo animal de estresse crônico. Em estudo prévio, foi observado que o ECMI induziu resistência à insulina, dislipidemia e disfunção endotelial, em ratos. Considerando que o aumento na atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido associado à disfunção endotelial e à resistência à insulina, o objetivo deste estudo foi investigar a participação do SRA sobre os efeitos cardiovasculares e metabólicos induzidos pelo ECMI, em ratos. Foram utilizados 62 ratos machos Sprague-Dawley, com dois meses de idade. A duração do período experimental foi de 7 semanas. No Experimento 1, os animais foram divididos em 2 grupos: controle e estresse. O ECMI foi aplicado nas semanas 3, 4 e 5 e os animais foram eutanasiados 1 e 15 dias após a aplicação do protocolo de ECMI. O ECMI aumentou a atividade sistêmica da renina e da enzima conversora de angiotensina (ECA), da ECA na aorta torácica e as concentrações plasmáticas de angiotensina II e angiotensina (1-7). Com base nestes resultados, que mostraram aumento da atividade do SRA induzido pelo ECMI, o Experimento 2 foi delineado com o objetivo de avaliar a participação da angiotensina II e do seu receptor AT1 nos efeitos desencadeados pelo ECMI sobre a captação de glicose e sobre o sistema cardiovascular. Outros animais foram divididos em 4 grupos experimentais: controle, estresse, controle losartan (antagonista do receptor AT1 - 50 mg/Kg/dia, v.o.) e estresse losartan. O ECMI induziu aumento da área sob a curva, no teste de tolerância à glicose (TTG), diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina na aorta torácica *in vitro* e aumento da pressão arterial *in vivo*, em comparação com o grupo controle, sem haver diferença entre os grupos controle, controle losartan e estresse losartan. Estes resultados mostram que os efeitos do ECMI levaram ao processo de disfunção endotelial em ratos, os quais foram associados positivamente à hiperatividade do SRA, bem como foram cancelados pelo tratamento com losartan. Assim, este estudo esclarece parte dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas alterações metabólicas e cardiovasculares decorrentes do estresse crônico, demonstrando que estas alterações são mediadas pelo receptor AT1, provavelmente pela ligação da angiotensina II ao mesmo.

**Palavras-chave:** estresse crônico, disfunção cardiovascular, sistema renina-angiotensina, receptor AT1, disfunção endotelial.

## ABSTRACT

Chronic stress is a risk factor for the development of hypertension, atherosclerosis and diabetes. The protocol of chronic mild and unpredictable stress (CMUS) is an animal model of chronic stress. Previously, it has been shown that CMUS induced insulin resistance, dyslipidemia and endothelial dysfunction in rats. Considering that endothelial dysfunction and insulin resistance have been associated with high activity of renin-angiotensin system (RAS), the aim of this study was to investigate the involvement of RAS components on cardiovascular effects induced by CMUS in rats. Sixty two male Sprague-Dawley rats, (2 months old) were used. The experiment period was 7 weeks. In experiment 1, animals were divided into 2 groups: control and stress. The CMUS was applied on weeks 3, 4 and 5 and animals were euthanized 1 and 15 days after the CMUS. The CMUS increased systemic renin and angiotensin converting enzyme (ACE) activity, ACE activity in the thoracic aorta and plasma angiotensin II and angiotensin (1-7) concentrations. Based on these results, showing increased activity of the RAS induced by ECMI, the second experiment was designed to evaluate the involvement of angiotensin II and its AT1 receptor in the effects triggered by CMUS on glucose uptake and on cardiovascular system. Other animals were divided into 4 experimental groups: control, stress, losartan control (AT1 receptor antagonist, losartan - 50 mg /kg/day, orally) and losartan stress. The CMUS induced an increase in area under the curve in the glucose tolerance test (GTT), decreased the *in vitro* vasodilator response to acetylcholine in the thoracic aorta and increased blood pressure, compared to control group, without difference among control, losartan control and losartan stress group. These results show that the effects of CMUS led to endothelial dysfunction in rats, which was positively associated with hyperactivity of the RAS and was canceled by the treatment with losartan. Thus, this study explains part of the physiological mechanisms involved in cardiovascular and metabolic changes resulting from chronic stress, demonstrating that these changes are mediated by the AT1 receptor, probably by angiotensin II binding to it.

**Keywords:** Chronic stress, cardiovascular dysfunction, angiotensin renin system, AT1 receptor, endothelial dysfunction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

SRA – Sistema renina - angiotensina

ECMI – Estresse crônico moderado e imprevisível

TTG – Teste de tolerância à glicose

DM – Diabetes *Mellitus*

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECA 2 – Enzima conversora de angiotensina 2

NEP – Endopeptidase neutra

PEP – Prolil endopeptidase

HPLC - *High-performance liquid chromatography* – Cromatografia líquida de alta performance

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O estresse.....	3
2.2 Estresse, sistema cardiovascular e alterações metabólicas.....	5
2.3 Estresse e SRA.....	11
3. PROPOSIÇÃO.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXO 1 (Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa).....	63

## 1. INTRODUÇÃO

O estresse crônico é uma das principais características do estilo de vida da sociedade moderna e está diretamente relacionado à ativação de áreas límbicas do sistema nervoso central, hiperatividade do sistema nervoso simpático e à ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (Grisk & Retting, 2004).

Com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia desse sistema, diferentes modelos animais têm sido utilizados. Sabe-se que ratos adaptam-se rapidamente à aplicação repetida de estímulos estressores, porém esta adaptação não ocorre em protocolos de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), caracterizados pela aplicação de diferentes estressores de forma alternada (Moreau *et al.*, 1993; Willner, 1997; 2005). Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que o ECMI pode induzir dislipidemia, aumento da área sob a curva no teste de tolerância à glicose (TTG) e desenvolvimento de resistência à insulina (Neves *et al.*, 2009; 2011). Esses resultados corroboram outros estudos experimentais e mostram que tanto a aplicação do protocolo de ECMI como do estresse crônico apenas por meio de imobilização, também podem ativar o SRA e desencadear tais alterações (Grippe & Johnson, 2010; Chung *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o aumento na atividade do SRA tem sido relacionado não só ao desenvolvimento de hipertensão, mas também de resistência à insulina (Wichi *et al.* 2007), diabetes *mellitus* (DM) (Lardizabal & Deedwania, 2010), disfunção endotelial (Chung *et al.*, 2010) e aterosclerose (Wolf *et al.*, 2003). Assim, o estudo da influência dos componentes deste sistema sobre a disfunção endotelial pode contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos relacionados a este processo.

Um dos principais componentes do SRA é a angiotensina II, uma citocina multifuncional reconhecida principalmente por sua ação vasoconstritora (quando atua via receptor AT1), além de poder atuar como fator de crescimento, citocina pró-fibrinogênica, pró-inflamatória (Wolf *et al.*, 2003) e moduladora da resposta imunológica (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001). Na presença de hiperinsulinemia, a angiotensina II potencializa a proliferação de células do músculo liso vascular e endoteliais (Stenhower *et al.*, 1997). Além disso, a angiotensina II pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a

biodisponibilidade de óxido nítrico, resultando em injúria vascular (Hsueh *et al.*, 2004). Considerando estes efeitos, foi observado que inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e antagonistas de receptores de angiotensina podem reduzir a incidência de ocorrência de diabetes em pacientes hipertensos (Dahlof *et al.*, 2002), bem como prevenir as complicações vasculares decorrentes de nefropatia e retinopatia diabética (Mc Farlane *et al.* 2003). Além disso, o tratamento com losartan, antagonista de receptores AT1, reverteu parcialmente a diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina, o aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina e da produção de ânions superóxido, em artérias cerebrais e carótidas (Zhang *et al.*, 2009) de ratos submetidos à microgravidade.

Entretanto, não se sabe até o momento se há envolvimento do SRA nas alterações cardiovasculares e metabólicas desencadeadas pelo ECMI. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível participação dos componentes deste sistema, e mais especificamente da angiotensina II, sobre as alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pelo ECMI, em ratos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O estresse**

O estresse humano é um dos mais significativos problemas de saúde na sociedade moderna (Kudielka & Wust, 2010) podendo ser definido como uma experiência subjetiva desencadeada por qualquer estímulo aversivo que, ao ativar determinadas áreas do sistema nervoso central, torna-se responsável por causar alterações sistêmicas generalizadas e não específicas. Em outras palavras, o estresse resulta em qualquer mudança na homeostase de um indivíduo, que requer uma resposta adaptativa dele mesmo (Ursin & Eriksen, 2004).

O conceito de estresse é embasado em antigas concepções que datam da História Antiga, nas quais, palavras como harmonia, equilíbrio, balanço e estado estável eram usadas para se descrever uma característica básica de vida, sendo a saúde reconhecida como um estado de harmonia e, doenças, como desarmonia (Chrousos & Gold, 1992). Entretanto, o termo estresse foi originalmente empregado em Física, no sentido de identificar o grau de deformidade sofrido por um material quando submetido a um esforço ou tensão (Goldstein & Kopin, 2007). Partindo desses princípios, três importantes fisiologistas, Claude Bernard, Walter Cannon e Hans Selye, passaram a fazer a analogia entre o conceito da Física, a perda da homeostasia e o surgimento de doenças (Le Moal, 2007).

Dentre estes, Hans Selye é considerado o precursor da utilização e popularização do termo estresse no sentido fisiológico ao observar que, após a aplicação de solução salina a animais utilizados como controle, estes desenvolviam uma série de respostas semelhantes àquelas observadas no grupo tratado com extratos de plantas: úlceras no trato gastro-intestinal, hipertrofia da glândula adrenal e atrofia do timo (Selye, 1936; Le Moal, 2007). Estas alterações foram atribuídas ao estímulo induzido pela aplicação das repetidas injeções, que teriam desencadeado um esforço adaptativo no organismo desses animais na tentativa de manter a homeostasia e enfrentar tais situações percebidas como desagradáveis (Selye, 1936; Ursin & Eriksen, 2004). Sendo assim, as injeções são



estímulos estressores e as alterações desencadeadas por estas constituem a reação de estresse.

Pelo fato desses estímulos terem causado respostas hormonais generalizadas e não específicas, atingindo diferentes sistemas orgânicos, Selye as denominou como Síndrome Geral da Adaptação, sendo constituída por três fases: de *alarme ou excitação*, de *resistência* e de *exaustão* (Tanno & Marcondes, 2002; Le Moal, 2007). Na primeira fase, há a ativação do sistema nervoso simpático e do sistema adrenocortical, com liberação de catecolaminas (pela medula da adrenal) e de glicocorticóides (pelo córtex da adrenal), a fim de se restaurar a homeostase. Essa restauração leva à segunda fase, de resistência, na qual a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos. Se o estímulo estressor permanecer, a resposta adaptativa cessa, e ocorre a terceira fase, a exaustão, trazendo como consequências doenças cardiovasculares, renais, imunológicas e até mesmo a morte (Selye, 1936, Tanno & Marcondes, 2002; McEwen, 2006).

Embora existam semelhanças entre as respostas obtidas em diferentes organismos frente a um único estímulo estressor, como observado nos experimentos de Selye, sabe-se que cada organismo não é exatamente constante e tende a responder diversificadamente em determinadas ocasiões devido às suas variações comportamentais (relacionadas à ativação do sistema límbico) e fisiológicas normais (como por exemplo, a variabilidade de respostas que podem ser observadas entre roedores machos e fêmeas, ao serem submetidos ao mesmo experimento) (Wood & Shors, 1998). Por isso, houve uma reinterpretação do conceito clássico de estresse, considerando que seus mediadores podem ter tanto efeitos protetores quanto prejudiciais ao organismo, dependendo do tempo, da intensidade de sua secreção e de características do indivíduo. Atualmente, uma nova terminologia tem sido empregada para descrever a resposta biológica frente a um estímulo aversivo (McEwen, 2005; 2011). Segundo McEwen (2006), a alostase é um termo utilizado para descrever os processos adaptativos usados para manter a estabilidade de um organismo por meio de processos ativos. Os primeiros mediadores da alostase incluem os hormônios do eixo hipotálamo - hipófise - adrenal (HHA), as catecolaminas e as citocinas. Quando essas respostas variam além dos limites dos mecanismos homeostáticos (responsáveis por exercerem importante influência em várias funções vitais como a respiração, o tônus

cardiovascular e o metabolismo intermediário) (Loures *et al.*, 2002) são reconhecidas como carga alostática (McEwen, 2005; Goldstein & Kopin, 2007; Grassi-Oliveira *et al.*, 2008). Assim, a carga alostática resulta em um desequilíbrio dos mediadores primários, refletindo em uma produção excessiva de alguns e inadequada de outros. Acredita-se que essa desordem seja responsável pelo surgimento e desenvolvimento de várias doenças (McEwen, 2006).

Devido às limitações inerentes à pesquisa envolvendo seres humanos, e para complementar os estudos clínicos e epidemiológicos, modelos animais têm sido muito úteis no estudo dos efeitos deletérios desencadeados pelo estresse. Apesar de estar bem estabelecido que roedores adaptam-se à aplicação repetida de estímulos estressores, esta adaptação não ocorre nos protocolos ECMI. Nestes protocolos, a exposição a diferentes estressores alternadamente induziu elevação mantida na concentração de corticosterona em ratos (Moreau *et al.*, 1993; Willner, 2005), observada até 15 dias após a aplicação do estímulo estressor (Neves *et al.*, 2009). O ECMI também aumentou a concentração plasmática de fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 beta, aldosterona e corticosterona (Grippo *et al.*, 2005), elevação da frequência cardíaca de repouso, diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e diminuição do limiar para arritmias ventriculares (Grippo *et al.* 2002; 2003), evidenciando os efeitos deletérios do estresse crônico sobre o sistema cardiovascular.

## **2.2 Estresse, sistema cardiovascular e alterações metabólicas**

O sistema cardiovascular participa ativamente do processo adaptativo na reação de estresse, seja por um aumento da frequência cardíaca, da contratilidade, do débito cardíaco ou da pressão arterial (Krantz & Manuck, 1984). Em um organismo saudável, a ativação estressora de curta duração, além de não ser capaz de promover efeitos maléficos, tende a desencadear efeitos protetores a esse sistema, sendo estes, fundamentais para a sobrevivência na presença de qualquer situação em que exista um perigo iminente (Loures *et al.*, 2002; Ursin & Eriksen, 2004) e necessidade de manutenção da homeostasia (McEwen, 2006).

Normalmente, a pressão arterial sofre várias alterações durante o dia para se adaptar às mudanças físicas e emocionais, fornecendo o fluxo sanguíneo adequado, quando necessário (McEwen, 2006). No entanto, a deficiência de um mecanismo adaptativo junto à elevação repetida da pressão arterial pode promover a geração de placas de aterosclerose, principalmente quando combinadas com fatores metabólicos que danificam a parede da artéria coronária (McEwen, 2006). Dessa forma, as respostas negativas associadas ao estresse podem ser decorrentes tanto pelo fato do estímulo estressor ter se tornado muito intenso (Loures *et al.*, 2002) quanto por características individuais de cada organismo, relacionadas também à susceptibilidade genética e presença ou ausência de determinadas doenças (Krantz & Manuck, 1984).

Adicionalmente, um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da pressão arterial é a ativação do sistema nervoso simpático (por ação do sistema nervoso central) e/ou de mediadores inflamatórios que podem ser desencadeados pelo estresse crônico e contribuir para a formação de aterosclerose, hipertrofia cardiovascular e arritmias cardíacas (Esler & Kaye, 2000; Brotman *et al.*, 2007; Chumaeva *et al.*, 2009), podendo o estresse crônico nesse contexto, levar a complicações cardiovasculares como a doença arterial coronariana (Chandola *et al.*, 2008).

A aterosclerose coronariana caracteriza-se pelo estreitamento e deterioração das artérias coronárias, as quais são responsáveis pela nutrição do coração. A formação dessas placas pode ocorrer por anos sem serem detectadas, afetando a função cardíaca somente ao causar um grau de obstrução suficiente para diminuir o fornecimento de sangue ao coração. Quando isso ocorre, a aterosclerose coronária evolui para uma doença cardíaca coronariana clínica, conhecida como doença isquêmica do coração (Hurst *et al.*, 1978).

Adicionalmente, estudos indicam que há uma correlação entre a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), o estresse e as alterações cardiovasculares (Mezzacappa *et al.*, 2001). Foi verificado que a redução da VFC é um preditivo de morte para pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio (La Rovere *et al.*, 1998), tendo uma relação diretamente proporcional à piora do prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva descompensada (Aronson *et al.*, 2004) ou outras complicações cardiovasculares (Stein & Kleiger, 1999).

Durante a reação de estresse, as catecolaminas e os glicocorticóides desempenham um papel fundamental na mobilização de substratos energéticos para o coração, sistema nervoso central e tecido muscular esquelético. Estes hormônios, além de estimularem a glicogenólise, lipólise e proteólise, inibem a captação de glicose em tecidos cuja função não é essencial durante a exposição ao estressor (Tanno & Marcondes, 2002; Mello *et al.*, 2003).

Por isso, os glicocorticóides podem ser reconhecidos por prejudicar a captação de glicose mediada pela insulina no músculo esquelético, provavelmente por inibirem a translocação do transportador de glicose GLUT 4 de sua membrana interna para a membrana plasmática. Essa inibição pode ocorrer através de mecanismos de *downregulation* de várias proteínas sinalizadoras, importantes na mediação da cascata de fosforilação da tirosina do receptor de insulina GLUT 4. No entanto, esse mecanismo de ação ainda é controverso (McCowen, *et al.*, 2001; Van Cromphaut, 2009).

Apesar da relação entre a atividade simpática e o metabolismo de glicose e insulina não estar totalmente esclarecida, observa-se que há um aumento significativo da resistência à insulina e elevados níveis de glicemia em situações estressoras (Kjeldsen, 1996; Rubinstein *et al.*, 2010). Nesse caso, há destaque para o cortisol, principal glicocorticóide liberado em resposta ao estresse (Roy *et al.*, 2001; Kudielka & Wust, 2010), capaz de influenciar no metabolismo da glicose (McCowen *et al.*, 2001; Nowotny *et al.*, 2010). Dessa forma, além do aumento na concentração de cortisol dificultar o controle glicêmico, também predispõe ao desenvolvimento de hiperglicemia (Boyle *et al.*, 2007), favorecendo um desequilíbrio metabólico devido à constante estimulação do sistema nervoso simpático (Esler & Kaye, 2000).

Uma doença que pode ser desencadeada ou agravada pelo estresse é o DM. O DM tipo 2 é a forma mais comum desse tipo de acometimento, abrangendo 90% dos casos diagnosticados e caracterizado principalmente pela ocorrência de resistência à insulina (Rabin, 2007). Nesse contexto, em pacientes diabéticos expostos a situações estressantes, o aumento na secreção de cortisol induzida por estressores contribui para a piora do controle glicêmico e da sensibilidade à insulina, conseqüentemente induzindo maior prevalência de complicações crônicas provocadas por essa doença (Andrews & Walker, 1999; Chiodini *et*

*al.*, 2005; 2007). Já o DM tipo 1, apesar da sua menor prevalência, também tem sido evidenciado sofrer influência do estresse. Em uma pesquisa conduzida por Wiesli *et al.* (2005) foi verificado que 20 pacientes com DM tipo I expostos a um teste de estresse mental apresentaram retardo no decréscimo de concentração da glicose no período pós - prandial, quando comparado ao grupo diabético não submetidos ao estresse.

De acordo com Muller (2007), o estresse também pode influenciar o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e mudanças endócrinas em pacientes não diabéticos, mas com estado de saúde comprometido, favorecendo o surgimento de quadros hiperglicêmicos. Desse modo, entende-se que a presença de determinadas doenças, o comprometimento da saúde, bem como a própria internação, podem atuar como estímulos estressores e permanentes que, além de elevarem a glicemia, aumentam o índice de morbidade e mortalidade nesses pacientes, devido à hiperglicemia estar associada ao retardamento de tratamentos hospitalares (Dungan *et al.*, 2009) e ao maior risco de complicações infecciosas em indivíduos que passaram por procedimentos cirúrgicos (McCowen *et al.*, 2001). Um estudo realizado com a população registrada no setor de emergência em um hospital dos EUA mostrou que 60% dos pacientes diagnosticados com hiperglicemia tiveram o diabetes confirmado no prazo de um ano (Greci *et al.*, 2003). Sendo assim, atenção redobrada deve ser direcionada aos indivíduos hiperglicêmicos, principalmente porque a hiperglicemia pode ser decorrente da resposta ao estresse desencadeada pela própria internação (Wallander *et al.*, 2008).

Como citado anteriormente, os efeitos do estresse não somente alteram o metabolismo da glicose como também o das proteínas e dos lipídios. Como consequência, o aumento nos níveis de ácidos graxos promovem redução significativa da sensibilidade à insulina tecidual, favorecendo a resistência ao hormônio. A diminuição da ação da insulina e a crescente liberação das catecolaminas e cortisol estimulam o aumento da lipólise, a mobilização de ácidos graxos e glicerol de depósitos de gordura, bem como a proteólise muscular. Os aminoácidos, associados ao glicerol e ao lactato fornecem os precursores necessários para a gliconeogênese e, associados à deficiência de mecanismos regulatórios pela insulina, facilitam a síntese de triglicerídeos hepáticos. Assim, o alto fornecimento de

ácidos graxos acaba por estimular a secreção de VLDL (lipoproteína de muito baixa intensidade) a partir do fígado (Brindley *et al.*, 1993).

Na reação de estresse, os ácidos graxos podem ser derivados de três fontes: da mobilização do tecido adiposo, do aumento da síntese de ácidos graxos por efeitos combinados da insulina e do cortisol, e do aumento do consumo de alimentos ricos em gorduras que favorecem a produção de quilomícrons remanescentes, os quais estão associados à hiperfagia (Brindley *et al.*, 1993). Com relação à ingestão alimentar, sabe-se que em resposta ao estresse, algumas pessoas tendem a perder enquanto outras tendem a ganhar peso. Acredita-se que isso esteja relacionado à ativação de determinadas áreas do sistema límbico no sistema nervoso central e ocorra devido ao aumento da ativação  $\beta$  – adrenérgica que pode levar à perda de peso por atuar no mecanismo de lipólise (Kuo *et al.*, 2008), ou então, pelo aumento do consumo das conhecidas “comidas de conforto”, ricas em gorduras e açúcares (Dallman *et al.*, 2005). Segundo Gonzalez-Bono *et al.* (2001), tanto o estado alimentado quanto o jejum podem aumentar a atividade do eixo hipotálamo - hipófise - adrenal, sugerindo diferentes mecanismos subjacentes na interação entre o fluxo calórico e níveis de hormônios relacionados ao estresse, como o cortisol. Além disso, o aumento da adrenalina (Cagampang *et al.*, 2011) também parece ser, em médio e longo prazo, um fator que favorece o aumento do índice de massa corporal de indivíduos saudáveis (Flaa *et al.*, 2008).

No entanto, separadamente, apenas o estresse (dependendo do tipo e intensidade) ou a dieta (dependendo do tipo da dieta hipercalórica), podem não ser capazes de induzir a obesidade, considerando que muitas vezes o estresse tende a diminuir a adiposidade em ratos (Kuo *et al.*, 2008). Porém, quando combinados, o estresse crônico e a dieta hipercalórica podem levar à obesidade abdominal devido a diversos mecanismos, que incluem a liberação do neuropeptídeo Y (NPY) diretamente no tecido adiposo (Kuo *et al.*, 2007; Karalis *et al.*, 2009).

Estudos revelam que a obesidade é um problema de saúde global e afeta mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo (Lois & Kumar, 2009). Associadas a ela, existem mais de 45 co-morbidades e desordens aterogênicas. Além disso, é reconhecida pelo guia da Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation*

*guidelines*) como uma condição progressiva contribuinte para o desenvolvimento de câncer (Johansen *et al.*, 2010), diabetes, desordens cardiovasculares e aumento de mortalidade por tais causas (Lois & Kumar, 2009). Hotamisligil *et al.* (1993), já haviam demonstrado que a obesidade poderia ser caracterizada como uma “inflamação sistêmica de baixo grau”, induzida por diferentes mediadores inflamatórios, porém, há aproximadamente uma década, é que de fato os cientistas passaram a analisá-la como um estado inflamatório (Lois & Kumar, 2009). O aumento plasmático de células mononucleares e linfócitos em indivíduos obesos, assim como de tecido adiposo e da concentração sanguínea de fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 e interleucina-6 são compatíveis com essa sugestão (Senn *et al.*, 2002). O tecido adiposo, por si só, é considerado como o primeiro sítio da geração do estado pró-inflamatório, que eventualmente torna-se sistêmico (Lois & Kumar, 2009; Balistreri *et al.*, 2010).

Assim como a obesidade favorece a liberação de mediadores inflamatórios, o estresse crônico parece interferir na resposta imunológica por meio da liberação excessiva de cortisol (Karalis *et al.*, 2009), e consequente diminuição da proliferação de células do tipo B e T em camundongos diabéticos (Rubinstein *et al.*, 2010). Já o estresse crônico associado à dieta rica em açúcares e gorduras, promove aumento da concentração de glicocorticóides primeiramente na gordura visceral (por mecanismo relacionado à dehidrogenase 11b-hidroxiesteróide - 11b-HSD1 - uma enzima que catalisa a conversão do cortisol inativo em 11b-HSD1 ativo) (Karalis *et al.*, 2009), e, depois, por meio da angiogênese e adipogênese, tende a induzir o crescimento da área abdominal, que com o tempo, leva à inflamação tecidual, hipervascularização e mudanças hormonais como a hiperinsulinemia e a hiperlipidemia (Kuo *et al.*, 2008). Esses dados comprovam que uma sobreposição entre a via de sinalização metabólica e inflamatória piora o efeito da insulina no tecido periférico (Senn *et al.*, 2002) e é relacionada ao estado pró-inflamatório decorrente da obesidade e do estresse, à resistência insulínica e ao diabetes (Kuo *et al.*, 2008; Lois & Kumar, 2009).

As disfunções metabólicas da glicose e dos lipídios, como várias desordens aterogênicas desencadeadas pela obesidade (Lois & Kumar, 2009), associadas a quadros de hipertensão, corroboram o surgimento de uma alteração de origem multifatorial

denominada Síndrome Metabólica (SM) (Pyykkonen *et al.*, 2010). A incidência da SM tem sido alta e crescente em todo o mundo e é decorrente do chamado “estilo de vida ocidental moderno”. O principal ponto negativo desse estilo de vida inclui o estresse (em longo prazo e contínuo), balanço energético positivo (excessivo consumo de energia e baixa atividade física), baixa qualidade de sono e alimentar (alta ingestão de comidas calóricas e, ao mesmo tempo, pobres em micronutrientes) (Monteiro & Azevedo, 2010; Kim *et al.*, 2011). Da mesma forma que a SM tem origem multifatorial, também pode favorecer a disfunção de diversos mecanismos do organismo (Pyykkonen *et al.*, 2010). Assim, além de poder ser desencadeada em resposta ao estresse (Seematter *et al.*, 2000), acaba se tornando fator de risco para o desenvolvimento de DM tipo 2 e doenças cardiovasculares, e pode aumentar a taxa de mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares e de outras causas (Li *et al.*, 2010; McGrady, 2010), o que demonstra ainda mais que as variadas respostas ao estresse, afetam diretamente o sistema cardiovascular e metabólico.

### **2.3 Estresse e SRA**

Ao investigar os processos fisiopatológicos envolvidos nas disfunções cardiovasculares desencadeadas pelo estresse, tem-se dado grande destaque ao SRA. O SRA corresponde a um complexo sistema hormonal cujo papel fundamental relaciona-se ao controle da pressão arterial, equilíbrio hidro-salino, volume extracelular e resistência vascular (Fleming *et al.*, 2005; Harrison-Bernard, 2009).

Há aproximadamente um século que o SRA tem sido estudado, no entanto, somente a partir de 1930 esses estudos foram realizados de forma consistente e a renina foi reconhecida como uma peptidase capaz de produzir o peptídeo angiotensina I. A partir de então, vários trabalhos foram conduzidos a fim de se identificar e compreender tanto o mecanismo fisiológico quanto o patológico desse sistema (Inagami, 1998).

Classicamente, a renina é sintetizada e armazenada em sua forma inativa, denominada pró-renina, nas células justaglomerulares dos rins (células musculares lisas modificadas), localizadas nas paredes das arteríolas aferentes, imediatamente proximal aos glomérulos. Com a queda de pressão arterial, reações intrínsecas nos próprios rins fazem



com que moléculas de pró-renina nas células justaglomerulares sejam clivadas, liberando a renina que passa para a circulação renal e circula por todo o corpo. Como mencionado, a renina atua sobre o angiotensinogênio que libera a angiotensina I, um fraco vasoconstritor que, no entanto, ao sofrer a ação da ECA, dá origem à angiotensina II, reconhecida como um potente vasoconstritor. A angiotensina II torna-se responsável por induzir duas ações principais que poderão levar ao aumento da pressão arterial. A primeira, por meio de uma rápida vasoconstrição, principalmente das arteríolas, induz vasoconstrição periférica total e, a segunda, acarreta retenção renal de sal e de água (ao atuar diretamente nos rins, com diminuição da excreção de sal e de água, e também, induz a secreção de aldosterona pelas glândulas supra-renais, o que aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais) (Carey & Siragy, 2003; Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Basicamente, o SRA era conhecido por possuir apenas quatro componentes protéicos: a *renina* (que pertence à família da aspartil protease e se encontra elevada em 30% dos pacientes hipertensos, associada a um maior risco de doença cardiovascular quando sua concentração plasmática eleva-se), o *angiotensinogênio*, a *ECA* (uma metaloprotease identificada nos rins, cérebro e coração) e o *receptor de angiotensina II* (identificado no músculo liso vascular em duas formas: o AT1, que quando estimulado provoca a vasoconstrição e o AT2 que provoca vasodilatação supostamente mediada pela via do endotélio - óxido nítrico) (Siragy & Carey, 1997; Da Luz *et al.*, 2005).

Adicionalmente, novos componentes foram identificados, como o peptídeo vasodilatador angiotensina (1-7) que pode ser formado diretamente a partir da angiotensina I, pela ação de peptidases como a endopeptidase neutra [NEP], prolil endopeptidase [PEP] ou ser um metabólito intermediário da conversão da angiotensina II - via PEP ou prolil-carboxipeptidase, capaz de induzir a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (Carey & Siragy, 2003; Da Luz, *et al.*, 2005); a angiotensina III (outro metabólito da angiotensina II, encontrado no cérebro e no líquido cérebro-espinhal) e a angiotensina IV (um agonista endógeno, identificado em áreas cerebrais distintas onde receptores AT1 e AT2 estão localizados, atuando provavelmente por meio de um outro receptor, o AT4); bem como uma enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), que converte a angiotensina II em angiotensina (1-7) e que também medeia a conversão de angiotensina I em angiotensina (1-

9), que pode ser metabolizada em angiotensina (1-7) pela ECA), além de outros receptores como a prorenina e o *Mas* (Phillips & De Oliveira, 2008; Varagic *et al.*, 2008; Mertens *et al.*, 2010; Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000).

Apesar de o SRA fazer parte dos mecanismos fisiológicos fundamentais para a regulação da PA, alterações em seus componentes têm sido associadas ao desenvolvimento de diversas disfunções e doenças relacionadas ao estresse. A estimulação simpática induzida pelo estresse resulta em maior atividade das fibras simpáticas que inervam as células justaglomerulares e ativação dos receptores adrenérgicos presentes nos rins (Phillips, 1987), levando ao aumento na liberação de renina (Harrison-Bernard, 2009) e síntese de angiotensina II (Loures *et al.*, 2002). Além disto, a ativação do SRA está associada a aumento na formação de ânions superóxido, diminuição da síntese de óxido nítrico (Luft, 2010), aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial, aterosclerose (Han *et al.*, 2007; Daugherty *et al.*, 2010), apoptose, degradação mitocondrial, alteração bioenergética e acúmulo de lipídios em órgãos como o coração, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, estresse e depressão (Phillips & De Oliveira, 2008; Mertens *et al.*, 2010). A inibição farmacológica do SRA também tem sido amplamente utilizada (Ma, *et al.*, 2010) no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Kluger *et al.*, 1982), diabetes (Tikellis *et al.*, 2006), hipertrofia ventricular esquerda (Oigman & Neves, 2000), nefropatia diabética, hipertensão, edema pulmonar e sistêmico, cirrose hepática, esclerodermia, enxaqueca (Harrison-Bernard, 2009) e síndrome metabólica (De Kloet *et al.*, 2009; 2011).

Mesmo com a carência de estudos clínicos sobre os mecanismos envolvidos na associação estresse e o SRA e, ainda que essa relação não esteja bem estabelecida, sabe-se que a elevação dos níveis de renina e angiotensina II está relacionada principalmente a ações mediadas por receptores AT1 localizados na musculatura lisa vascular, musculatura cardíaca, gânglios simpáticos, na adrenal e na hipófise. Diante disso, durante as respostas cardiovasculares ao estresse mental, já foi demonstrado que a angiotensina II interage diretamente com os receptores vasculares ou cardíacos ou de forma indireta, por meio da modulação da atividade simpática (Aguilera, 1995).

Entretanto, dependendo da localização desses receptores, bem como do tipo de estressor utilizado, diferentes respostas podem ser desencadeadas, visto que a reatividade cardiovascular ao estresse emocional parece ser atenuada com a inativação de receptores AT1 cerebrais (seja pela inativação farmacológica ou genética), enquanto que estressores físicos não parecem desencadear os mesmos efeitos (Mayorov, 2011). Embora a literatura mostre que tanto o estresse agudo quanto o crônico possam alterar os níveis plasmáticos de renina e de componentes plasmáticos do SRA devido à estimulação simpática, (Groeschel & Braam, 2011), somente no estresse crônico parece haver ainda inibição da atividade da aldosterona sintetase e diminuição dos níveis de aldosterona (Aguilera, 1995). Porém, Ulrich-Lay *et al* (2006), observaram que apesar do estresse crônico aplicado durante 14 dias ter desencadeado hiperplasia e hipertrofia das glândulas adrenais de ratos machos Sprague-Dawley, esses estímulos não pareceram afetar o índice basal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a atividade do SRA e a produção de aldosterona via hormônio adrenocorticotrófico, comparado ao grupo controle.

Em relação à pressão arterial, foi observado que em ratos machos Wistar a pressão arterial média pode ser aumentada tanto pela estimulação estressora por imobilização, quanto pela infusão subcutânea de angiotensina II e contrariamente, diminuída de forma significativa após infusão subcutânea de angiotensina (1-7). Também foi visto que essas respostas podem ser alteradas por fatores como o ritmo circadiano (considerando que a infusão de angiotensina II pode promover uma inversão na acrofase do ritmo circadiano da pressão arterial média) e a presença ou não de estímulos estressores. Em animais estressados, a infusão de angiotensina (1-7) não alterou os valores da pressão arterial média anteriormente registrados, porém, surpreendentemente, em animais estressados que receberam infusão de angiotensina II houve um decréscimo significativo dessa medida (revertendo o aumento causado pelo estresse) (Braga *et al.*, 2002).

Já Loria *et al.* (2010) submeteram ratos neonatos Wistar Kyoto a um protocolo de estresse crônico comportamental e verificaram que embora os valores basais de angiotensina II, angiotensina (1-7), atividade plasmática da renina, pressão arterial e frequência cardíaca não terem se diferenciado entre os grupos, houve um aumento significativo na pressão arterial, na frequência cardíaca e na resposta inflamatória vascular

do grupo estressado após haver uma infusão crônica de angiotensina II por *minipumps*, indicando que o estresse prévio pode aumentar a reatividade cardiovascular à angiotensina II.

Os efeitos da estimulação crônica do SRA também podem ser verificados pelas mudanças morfológicas atriais observadas em modelos de ratos com superexpressão da ECA e de angiotensina II no coração, que desenvolveram arritmia cardíaca e morte súbita (Xiao *et al.*, 2004). Estes achados reforçam que a utilização de inibidores da ECA e de antagonistas de receptores AT1 podem atuar como fatores de proteção contra a progressão de várias doenças cardiovasculares (Fleming *et al.*, 2005), bem como na prevenção da ocorrência de hipertrofia do miócito e fibrose intersticial durante o processo de remodelação miocárdica em ratos (Epifanio *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2007).

De acordo com essas informações, Chung *et al.* (2010), verificaram que o aumento da pressão arterial sistólica, associado à diminuição do relaxamento (induzido pelo efeito vasodilatador da acetilcolina) em aorta torácica de ratos machos Sprague-Dawley submetidos ao estresse por imobilização, foram revertidos tanto pelo uso de inibidor da ECA quanto pelo antagonista de receptor AT1. Além disso, o desenvolvimento de disfunção endotelial induzido pelo estímulo estressor também regrediu após a utilização desses fármacos.

Alterações metabólicas também foram verificadas em ratos tratados com antagonista de receptor AT1. Após 18 semanas de tratamento, houve redução do ganho de tecido adiposo, decréscimo da massa tecidual adiposa (devido à hipotrofia epididimal e retroperitoneal) e decréscimo no tamanho dos adipócitos, (sem alterar sua quantidade). Além disso, dentre outros efeitos, os níveis de leptina sérica, do RNA mensageiro da leptina epididimal e do fator de necrose tumoral alfa decresceram, enquanto a síntese do RNA mensageiro de ácidos graxos, e dos níveis de adiponectina sérica e do RNA mensageiro da adiponectina epididimal aumentaram, indicando que a atividade do SRA local tem um importante papel no metabolismo do tecido adiposo (Zorad *et al.*, 2006).

Em estudo clínico, o tratamento de indivíduos hipertensos portadores de síndrome metabólica, com bloqueadores do SRA melhorou significativamente os níveis de colesterol total, triglicérides, LDL-colesterol, HDL-colesterol e adiponectina plasmática,

em comparação com grupos que realizaram outras terapias antihipertensivas (Ylmaz *et al.*, 2007). Diversos estudos clínicos e epidemiológicos mostraram que o tratamento com bloqueadores do receptor AT1 podem prevenir ou impedir o desenvolvimento de distúrbios renais em pacientes diabéticos e/ou hipertensos (Tocci & Volpe, 2011). Paralelamente, com o uso da mesma classe de medicamentos (antagonista de receptor AT1) foi possível reverter o aumento do estresse oxidativo e a diminuição da produção de óxido nítrico em homens saudáveis submetidos à hipóxia intermitente, semelhante ao que ocorre na apnéia obstrutiva do sono (Pialoux *et al.*, 2011).

Já um estudo realizado com pacientes obesos e hipertensos comparou o uso terapêutico do diurético hidroclorotiazida (capaz de diminuir a tolerância à glicose e a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas) associado ao uso de Valsartan (antagonista de receptor AT1) ou de Anlodipina (bloqueador dos canais de cálcio). Ao se comparar ao grupo que recebeu o tratamento de diurético + Anlodipina, o grupo que foi tratado com diurético + Valsartan obteve melhora significativa na secreção de insulina (estimulada pela presença de glicose), mostrando que o antagonista de receptor AT1 atenuou os efeitos negativos do diurético (Sowers *et al.*, 2010). Adicionalmente, dentre pacientes diagnosticados com estenose aórtica entre 1993 e 2008, na região de Tayside, no Reino Unido, aqueles que fizeram uso de bloqueadores do SRA (inibidores de ECA ou antagonistas de receptor AT1) apresentaram menor taxa de morbidade e mortalidade e de complicações cardiovasculares (Nadir *et al.*, 2011), demonstrando assim, que a inibição de receptores AT1 parece melhorar os parâmetros glicêmicos e cardiovasculares. Considerando a participação do SRA nas alterações cardiovasculares associadas ao estresse, é importante investigar a atividade deste sistema em animais submetidos ao ECMI com objetivo de se obter melhor compreensão sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos nos efeitos negativos desencadeados pelo estresse crônico.

### 3. PROPOSIÇÃO

- Investigar a participação do SRA nas alterações induzidas pelo ECMI, por meio da determinação da atividade da ECA no sangue e na aorta torácica, da renina circulante e a concentração de angiotensina I, II e (1-7) no plasma de ratos.
- Avaliar se os efeitos da angiotensina II, mediados pelo receptor AT1, estão envolvidos na disfunção endotelial e na resistência à insulina induzidos pelo ECMI, e seus impactos sobre a pressão arterial, por meio da análise da resposta ao TTG, sensibilidade da aorta torácica à acetilcolina *in vitro*, evolução temporal da pressão arterial e frequência cardíaca *in vivo*, em ratos controles e estressados, tratados ou não com o antagonista do receptor AT1 losartan.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Neste estudo foram feitos 2 experimentos e ao total foram utilizados 62 ratos machos Sprague-Dawley com 2 meses de idade, pesando inicialmente entre 300 e 350 g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais receberam ração para ratos Purina®, foram alojados em gaiolas individuais e em sala climatizada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 06:00 h), no Biotério do Depto de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - Processo CEEA nº 1829-1 (ANEXO 1).

### **4.2. Delineamento - Experimento 1 e 2**

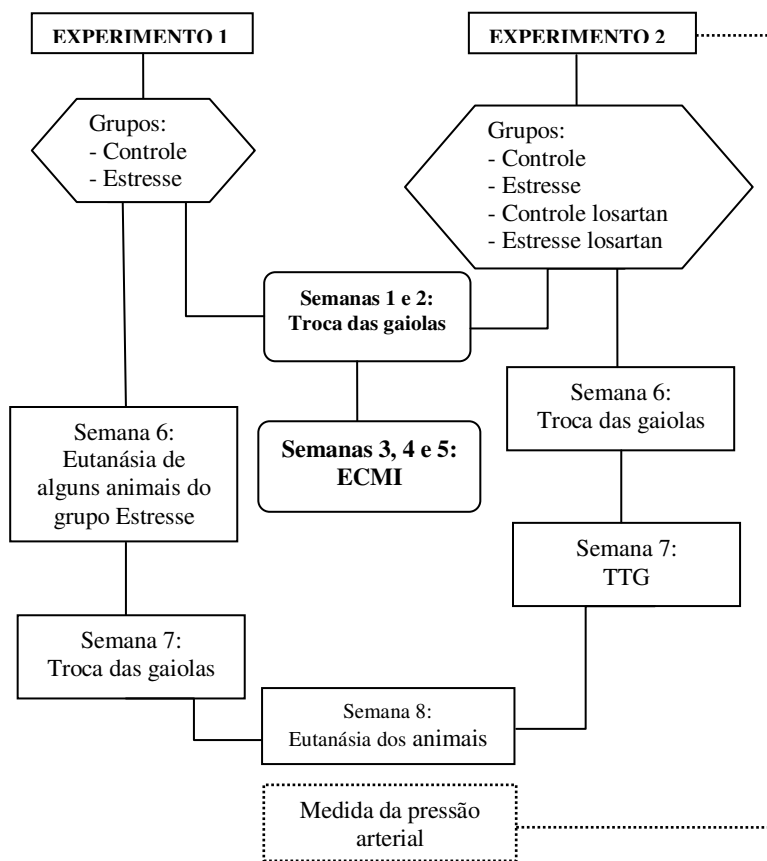
O período de ambos os experimentos teve a duração de 7 semanas (Figura 1) e o peso corporal foi registrado semanalmente para avaliação do efeito do ECMI, já que sua redução é um índice de estresse (Retana-Márquez. *et al.*, 2003).

No experimento 1, os animais foram divididos em 2 grupos: Controle e Estresse. Nas semanas 1, 2, 6 e 7 do período experimental, os animais foram submetidos aos procedimentos relacionados à troca e limpeza das gaiolas. O ECMI foi aplicado nas semanas 3, 4 e 5 e os animais foram eutanasiados, por decapitação, 15 dias após o término do último estímulo estressor. Alguns animais do grupo Estresse foram eutanasiados um dia após o fim do ECMI, com o objetivo de avaliarmos a evolução da concentração sanguínea de hormônios marcadores do estresse (corticosterona, adrenalina e noradrenalina) e confirmar o aumento mantido na secreção dos hormônios do estresse até 15 dias após o ECMI. Como o objetivo principal deste experimento foi avaliar o efeito, a longo prazo, do ECMI sobre a atividade do SRA, os demais animais foram eutanasiados 15 dias após finalizado o protocolo de estresse, com tempo equivalente para o grupo controle (no início da 8ª semana do período experimental). O sangue foi coletado para posterior determinação da atividade da renina e ECA e dosagem de catecolaminas, corticosterona e angiotensinas.

O terço médio da aorta torácica foi isolado e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise da atividade tecidual da ECA.

No experimento 2, outros animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle, Estresse, Controle losartan e Estresse losartan. Nos grupos tratados com losartan (Aradois®), este foi administrado na água ( $50\text{mg/Kg/dia}$ ), em volume aproximado ao consumo hídrico diário determinado em estudo piloto (média de consumo diário de aproximadamente  $30\text{ mL} \pm 2$ , tanto em grupos controle como estresse) e registrado por meio de pesagem das garrafas. Como o bloqueio de receptor AT1 pode aumentar a diurese, diminuir a volemia e estimular a secreção de renina, os animais tratados com losartan receberam solução de NaCl 1%, com o objetivo de diminuir estes efeitos, evitando assim a alteração da pressão arterial (Ronchi, 2006; Barauna *et al.*, 2008). Semanalmente (semanas 1 a 7), a pressão arterial foi registrada por pletismografia de cauda. Nas semanas 1, 2 e 6 do período experimental, os animais foram submetidos apenas aos procedimentos relacionados à troca e limpeza das gaiolas. Na semana 7, todos os animais foram submetidos ao TTG. Os ratos foram eutanasiados, por decapitação, 15 dias após o ECMI, para coleta de sangue. O terço médio da aorta torácica foi isolada para obtenção de curvas concentração-efeito à acetilcolina *in vitro*.





**Figura 1:** Fluxograma do delineamento experimental 1 e 2

### 4.3. Protocolo de Estresse

Na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas do período experimental, os animais foram submetidos ao protocolo de ECMI, modificado de acordo com Neves *et al.* (2009), a partir da metodologia descrita por Moreau (1997). O protocolo de ECMI consiste na aplicação de diferentes estímulos estressores ao longo de 7 dias, repetindo-se os procedimentos por 3 semanas consecutivas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível.

	Manhã	Tarde
Segunda-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	13:00-14:00 h: Imobilização 18:00 h: Iluminação contínua durante a noite
Terça-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização seguida de privação de água e comida durante 17 horas.
Quarta-feira	8:00 - 10:00 h: Acesso restrito a comida por 2 horas.	13:00 - 14:00 h: Imobilização seguida de privação de água por 18 horas.
Quinta-feira	8:00 – 10:00 h: Exposição a garrafas de água vazias. 11:00 – 12:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização seguida de alojamento em gaiolas com maravalha úmida durante 17 horas.
Sexta-feira	8:00 – 9:00 h: Imobilização	18:00 h: Ciclo claro/escuro invertido (até 08:00 h da segunda-feira seguinte)

#### 4.4. Determinação da concentração plasmática de corticosterona

A determinação da concentração plasmática de corticosterona foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico, utilizando-se kit comercial produzido pela Assay Designs® (Ann Arbor, MI, USA), com sensibilidade de 0,027 ng/mL e com coeficiente de variação intra e inter-ensaio de 7,7% e 9,7%, respectivamente.

#### 4.5. Determinação da concentração plasmática de catecolaminas

O plasma foi submetido à purificação conforme descrito por Di Marco *et al.* (2003). O sobrenadante foi filtrado (0,22 µm) e injetado em coluna de fase reversa. As catecolaminas foram separadas, usando um par iônico acoplado com detecção eletroquímica (0,5 V). A separação isocrática foi obtida usando uma coluna Spheri-5 ODS 5 µm. O sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) consta de uma bomba (modelo LC- 10 ADVP- Shimadzu), detector eletroquímico (modelo L-ECD- 6A- Shimadzu), injetor automático (SIL- 20AC- Shimadzu), coluna 5 µm, (4,6x 250 mm), pré-coluna RP 18,7µm (15x3,2 mm). As aminas biogênicas foram separadas por eluição isocrática, fluxo de 0,8 mL /minuto durante aproximadamente 25 minutos, sendo que a fase móvel foi composta de fosfato de sódio 0,02M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), citrato de sódio 0,02 M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), EDTA 0,12 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), heptano sulfônico 566 mg/L (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e metanol (Licrosolv) 10% e ajustado o pH para 2,53 com ácido

perclórico a 50% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), A concentração de monoamina foi expressa em pg/mL. Os cálculos foram feitos a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Pg A/mL} = \frac{\text{PsA/PsDHBA}}{\text{PstA/PstDHBA}} \times \text{quantidade do padrão} \times \text{fator de diluição}$$

Onde: A=amina; Ps= área do pico da amina na amostra; PstA= área do pico da amina no padrão; PsDHBA= área do pico do DHBA (dihidroxibenzilamina) na amostra; e PstDHBA= área do pico de DHBA no padrão. DHBA é o padrão interno de extração, usado para o cálculo de recuperação nos tempos de retenção esperados.

#### **4.6. Determinação da atividade da renina**

A determinação da atividade da renina foi realizada, segundo Prieto-Carrasquero *et al.* (2008), em amostras de plasma incubadas a 37°C com 1 nmol de tetradecapeptídeo em volume final de 1 mL de tampão Tris/HCl 0,05M na presença de um *pool* de inibidores (50 mM EDTA, 1.0 mM Ophe, 300 mM, PMSF and 200 mM DTT). Alíquotas do incubado foram coletadas nos tempos inicial e final, e a reação foi interrompida com 10 µL de ácido ortofosfórico 50%. A angiotensina I, produto da reação da renina sobre o tetradecapeptídeo, foi quantificada por HPLC de fase reversa usando uma coluna aquapore ODS 300, previamente equilibrada com 0,1% de ácido ortofosfórico contendo 5% de acetonitrila.

#### **4.7. Determinação da atividade da ECA**

A atividade enzimática da ECA foi determinada fluorimetricamente, utilizando-se Z-Phe-His-Leu (ZPhe-HL; ECA N-domínio) (1 mM) como substrato, segundo Friedland & Silverstein (1976) e Carmona *et al.*, (2005). O tampão padrão utilizado para os ensaios foi fosfato de dipotássio 0,1 M, pH 8,3, contendo NaCl 0,3M e ZnSO<sub>4</sub> 10<sup>-4</sup> M. Uma alíquota da amostra (soro ou homogenato de tecido) foi incubada com substrato a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com 1,5 mL de NaOH 0,28 N, e em seguida, foram adicionados 100 µL de ortoftaldialdeído (20 mg/mL em metanol), permanecendo em repouso durante 10 minutos para posterior adição de 200 µL de HCl 3 N, a fim de que a

reação fluorimétrica fosse interrompida. Em seguida, foi realizada a leitura da fluorescência (excitação: 360 nm; emissão: 500 nm) em espectrofluorímetro. Neste ensaio foi preparada uma solução branco, com o mesmo volume de amostra, substrato e reagentes citados, porém, tendo como diferença a adição de NaOH antes do substrato, não sendo necessário incubar esta solução. A curva padrão foi feita com uma solução His-Leu  $10^{-3}$  M para os posteriores cálculos da atividade da ECA. As medidas de unidades arbitrárias de fluorescência foram registradas para posterior cálculo e correção dos valores pela concentração protéica, determinada pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em mU/mL, no soro, e mU/mg de proteína nas amostras de tecido (aorta).

#### **4.8. Quantificação de Angiotensinas**

A concentração de angiotensinas foi determinada conforme descrito por Franco *et al.* (2008). Amostras de plasma foram concentradas em colunas C<sub>18</sub> Sep-Pak previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahydrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura etanol/ácido acético/água na proporção 90%/4%/6%. Os eluatos foram então liofilizados, redissolvidos em 500 µL de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido ortofosfórico) e filtrados com membrana 0,22 µm para serem analisados por HPLC. Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7µ, utilizando 5 min de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC. As angiotensinas I, II e (1-7) de cada amostra foram identificadas, comparando-as com o tempo de retenção das angiotensinas padrão no HPLC.

#### **4.9. Determinação da pressão arterial e frequência cardíaca**

Uma semana antes da análise da pressão arterial e da frequência cardíaca, foi realizado uma adaptação dos animais ao dispositivo. Durante todo o período experimental, uma vez por semana, foi verificada a pressão arterial dos animais por meio da conexão de um pletismógrafo (BP-2000 Blood Pressure Analysis System<sup>TM</sup>) à cauda dos mesmos

(Krege *et al.*, 1995), em sala com isolamento acústico e diminuição de quaisquer fontes de ruído que pudessem interferir nesta avaliação. Os ratos foram retirados do biotério e mantidos por 30 minutos no laboratório de experimentação para que pudessem se adaptar ao ambiente. Dois ratos, de grupos alternados foram colocados no aparelho, cada um dentro de um compartimento retangular adequado ao tamanho do animal, onde permaneceram por 5 minutos sobre uma plataforma aquecida a 36 °C e com a cauda já conectada ao “cuff” do aparelho. Após 5 minutos de adaptação do animal ao aparelho, este foi acionado e as medidas de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca foram coletadas. Em cada troca de animal cada compartimento retangular foi lavado com sabão neutro e secado para evitar que os odores liberados pelos ratos anteriormente analisados pudessem interferir nas análises subsequentes. As análises foram realizadas uma vez por semana entre as 8:00 e 12:00 h.

#### **4.10. Teste de tolerância à glicose**

Na sexta semana, após jejum de seis horas, os animais foram anestesiados superficialmente por inalação de halotano e uma amostra de sangue foi coletada da veia caudal, para determinação do valor de glicemia em jejum (Liang *et al.*, 2005). Em seguida, foi administrada solução de glicose (2 g/ kg) por via oral (gavagem). Após 30, 60, 90 e 120 minutos, o sangue foi novamente coletado, para determinação da glicemia (Liang *et al.*, 2005). Uma gota de sangue foi utilizada para determinação da glicemia, imediatamente após cada coleta, em glucosímetro digital.

#### **4.11. Curvas concentração-efeito à acetilcolina em aorta torácica isolada**

A aorta torácica foi cuidadosamente isolada para preservação do endotélio. Do terço medial de cada aorta foram obtidos dois anéis (3-5 mm), e montados sob 2 g de tensão inicial, em câmara para órgão isolado, contendo 20 mL de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição [mM]: NaCl 115,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,5; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11. Este último foi adicionado para diminuir a oxidação das catecolaminas, durante a obtenção das curvas

concentração-efeito (CCE). O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e a temperatura mantida em 36,5 ± 0,1°C, com auxílio de uma bomba de perfusão (Moura & Marcondes, 2001).

Antes da adição de qualquer substância, os anéis da aorta torácica permaneceram no banho para equilíbrio por 60 min e a solução de Krebs foi trocada a cada 15 min (Moura & Marcondes, 2001). Após o equilíbrio, a presença do endotélio foi comprovada fisiologicamente pela indução de relaxamento com a adição de acetilcolina (10<sup>-6</sup> M) em anéis pré-contraídos com fenilefrina (10<sup>-7</sup> M). Foi considerado que o endotélio estava presente nos anéis que apresentaram 100% de relaxamento. Anéis que apresentaram relaxamento inferior a 100%, em resposta à acetilcolina, foram descartados. Após este teste, os anéis foram lavados e mantidos para nova estabilização por um período de 45 min, com troca de solução de Krebs a cada 15 min (Moura & Marcondes, 2001).

Após estabilização e confirmação da integridade do endotélio, o anel foi contraído com fenilefrina 10<sup>-6</sup>M, e ao atingir a resposta em platô à fenilefrina, uma curva concentração-efeito cumulativa à acetilcolina foi obtida (3 x 10<sup>-8</sup> – 10<sup>-6</sup>M) (Feng *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008), e foi registrado o efeito vasodilatador da acetilcolina. Os resultados foram expressos em % da pré-contração induzida pela FE (Neves *et al.*, 2011).

#### **4.12. Análise estatística**

Os resultados do Experimento 1, foram comparados por teste t de *Student* para amostras não pareadas. Para comparação das concentrações hormonais entre os grupos controle e estresse sacrificados 1 dia e 15 dias após o ECMI, foi utilizada Análise de Variância Monofatorial, seguido de teste de Tukey.

Os resultados do Experimento 2, foram comparados por Análise de Variância Bifatorial. Quando o valor de F foi significativo, o teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias. Foram considerados como fatores o estresse e o tratamento com losartan. No fator estresse, houve dois níveis – controle (grupos não estressados) e estresse (grupos submetidos ao ECMI). No fator tratamento com losartan, também foram analisados dois níveis – não tratado com losartan e tratado com losartan. Além dos fatores principais, foi analisada a interação entre ambos.

Para ambos os experimentos, os valores de  $p$  menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

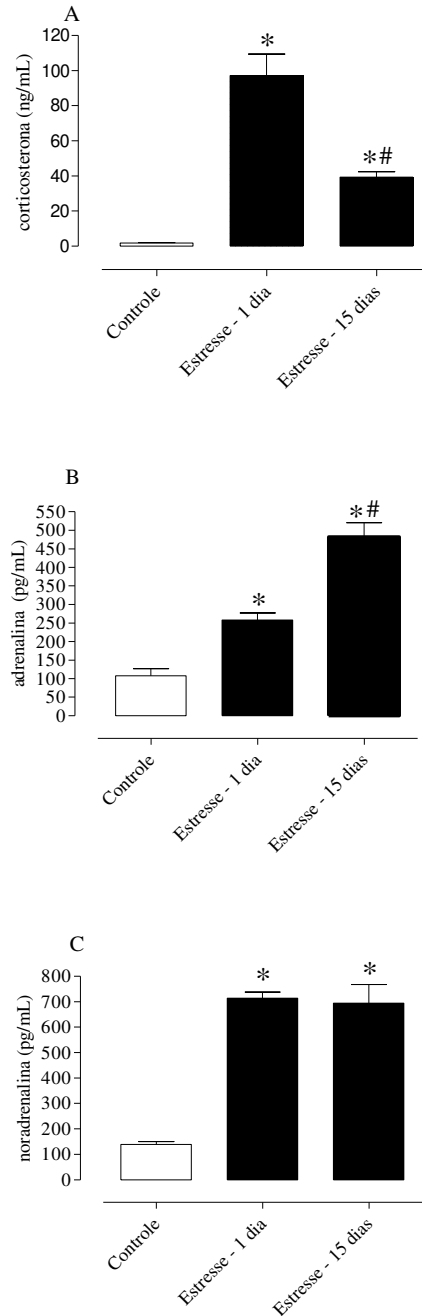
## 5. RESULTADOS

Nas Figuras 2, 3, 4 e 5 estão apresentados os resultados obtidos no experimento 1 e, nas Figuras 6, 7, 8 e 9, os resultados obtidos no experimento 2. Na Figura 2, são apresentados os dados referentes ao aumento da corticosterona plasmática um dia após a aplicação dos estímulos estressores ( $97,2 \pm 12,3$  ng/mL, Figura 2A), em comparação com o grupo controle ( $1,6 \pm 0,4$  ng/mL, Figura 2A;  $p < 0,05$ ). O grupo de animais estressados eutanasiados quinze dias após o ECMI apresentou concentração plasmática de corticosterona menor ( $39,2 \pm 3,1$  ng/mL, Figura 2A) do que observado um dia após o ECMI, porém significativamente maior em relação ao grupo controle (Figura 2A;  $p < 0,05$ ).

O ECMI também induziu aumento da secreção de adrenalina observado um dia após o ECMI ( $258,1 \pm 19,1$  pg/mL) em relação ao grupo controle ( $107,6 \pm 19,4$  pg/mL; Figura 2B;  $p < 0,05$ ). Animais eutanasiados quinze dias após o ECMI apresentaram maior concentração de adrenalina ( $482,6 \pm 37,6$  pg/mL) em relação aos grupos controle e estresse - 1 dia (Figura 2B,  $p < 0,05$ ).

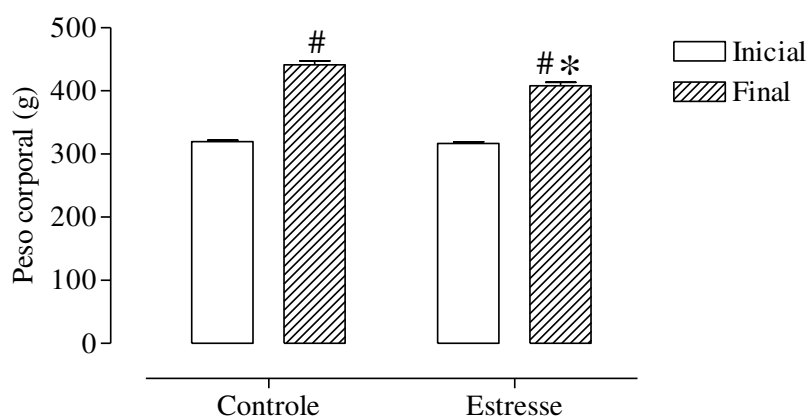
Um dia ( $714,0 \pm 24,3$  pg/mL) e quinze dias ( $603,2 \pm 75,9$  pg/mL) após o ECMI foi observado aumento da concentração plasmática de noradrenalina em relação ao grupo controle ( $139,6 \pm 10,4$  pg/mL; Figura 2C,  $p < 0,05$ ).





**Figura 2:** Concentração plasmática de corticosterona (A), adrenalina (B) e noradrenalina (C) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível e eutanasiados 1 ou 15 dias após o fim do ECMI. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão \*Diferença estatística em relação ao grupo controle; # Diferença estatística em relação ao grupo Estresse - 1 dia ( $p < 0,05$ ). N = 6-10/grupo.

Não foram constatadas diferenças estatísticas no peso corporal inicial entre os dois grupos experimentais (Figura 3,  $p > 0,05$ ). Ao final do período experimental, os animais dos dois grupos experimentais apresentaram média de peso corporal significativamente maior ao peso inicial ( $p < 0,05$ ). O peso corporal, ao final do período experimental, foi significativamente menor no grupo estresse (peso inicial:  $317 \pm 2$  g; peso final:  $408 \pm 5$  g) quando comparado ao grupo controle (peso inicial:  $320 \pm 2$  g; peso final:  $441 \pm 6$  g;  $p < 0,05$ ).



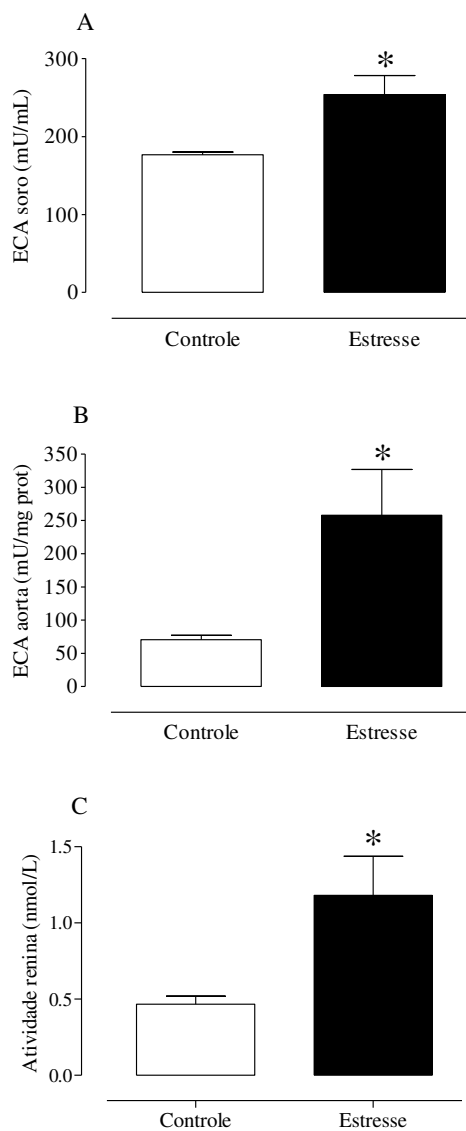
**Figura 3:** Efeito do estresse crônico moderado e imprevisível sobre a evolução do peso corporal (g). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão #Diferença significativa em relação ao peso corporal inicial no mesmo grupo ( $p < 0,05$ ). \*Diferença estatística em relação ao grupo controle no final do período experimental ( $p < 0,05$ ).  $N = 9/\text{grupo}$ .

Na Figura 4A, estão apresentados os dados referentes à atividade da ECA nos grupos controle ou submetidos ao ECMI, 15 dias após o estresse. O ECMI aumentou significativamente a atividade sérica da ECA, em relação ao grupo controle (controle:  $176,5 \pm 3,6$  vs. estresse:  $253,9 \pm 24,4$  mU/mL;  $p < 0,05$ ).

O ECMI também aumentou significativamente a atividade da ECA na aorta torácica de ratos, em relação ao grupo controle (controle:  $70,6 \pm 6,8$  vs. estresse:  $258,0 \pm 68,7$  mU/mg proteína;  $p < 0,05$ , Figura 4B).

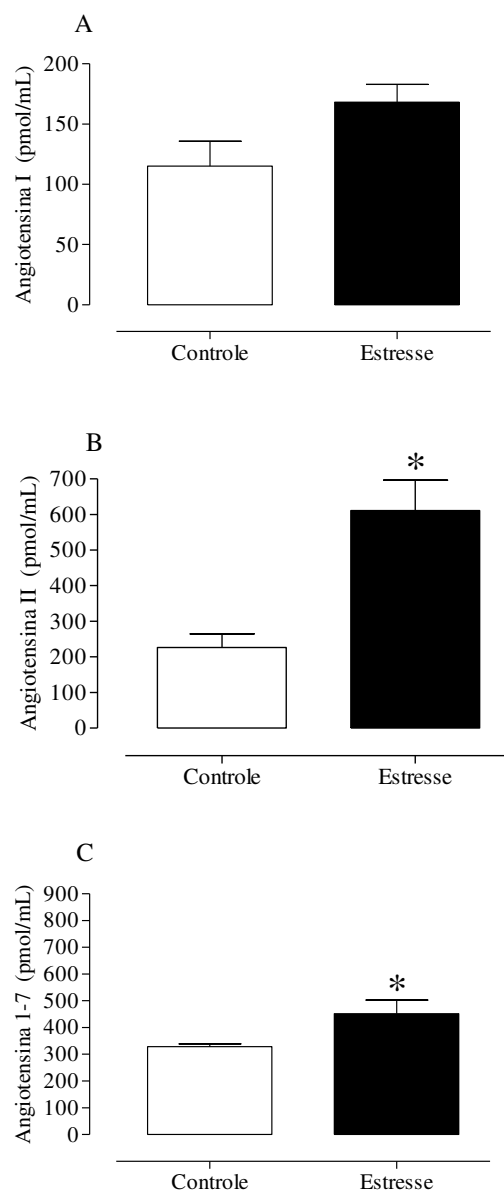
Também foi observado um aumento significativo da atividade da renina plasmática de animais submetidos ao ECMI ( $1,2 \pm 0,3$  mmol/L) em relação ao grupo

controle ( $0,5 \pm 0,1$  mmol/L;  $p < 0,05$ , Figura 4C).



**Figura 4:** Atividade sérica da enzima conversora de angiotensina (ECA) (A); atividade da ECA na aorta torácica (B) e atividade plasmática da renina (C) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão \*Diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $N=5-7$ /grupo).

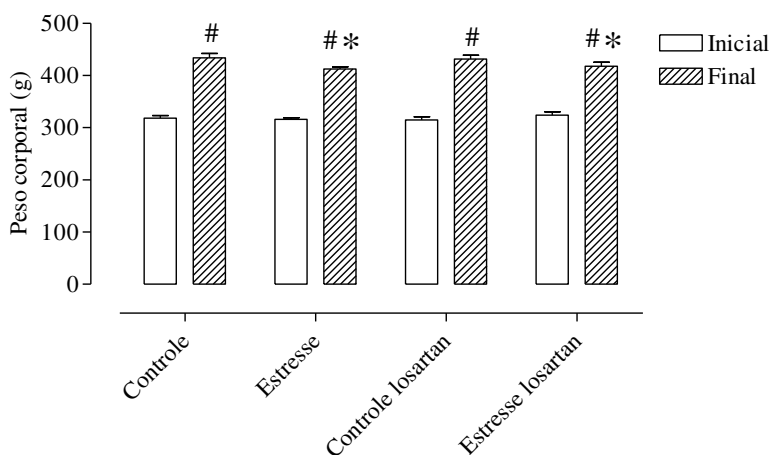
Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à concentração plasmática de angiotensina I (controle:  $115,1 \pm 20,7$  vs. estresse:  $168,3 \pm 14,5$  pmol/mL;  $p > 0,05$ , Figura 5A). Por outro lado, animais submetidos ao ECMI apresentaram aumento significativo nas concentrações de angiotensina II (controle:  $226,6 \pm 38,3$  vs. estresse:  $610,7 \pm 86,0$  pmol/mL;  $p < 0,05$ , Figura 5B) e angiotensina (1-7) (controle:  $329,1 \pm 10,1$  vs. estresse:  $452,2 \pm 51,0$  pmol/mL;  $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle (Figura 4C).



**Figura 5:** Concentração plasmática de angiotensina I (A), angiotensina II (B) e angiotensina (1-7) (C) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão \*Diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $N = 5-6$ /grupo).

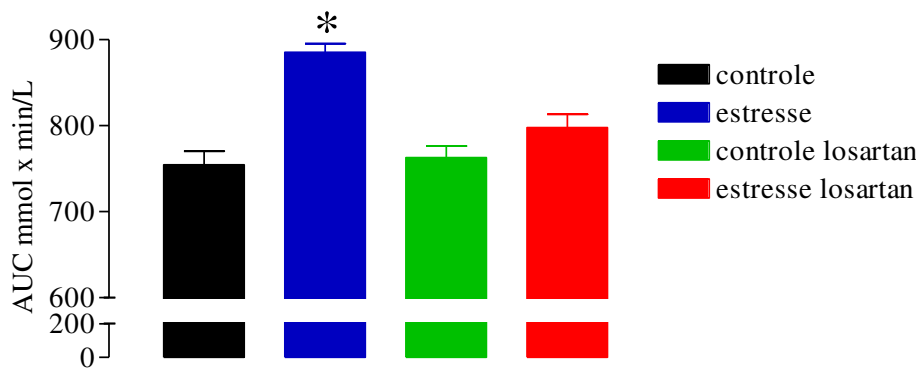
No estudo 2, não foram observadas diferenças significativas no peso inicial dos grupos estudados (Figura 6;  $p > 0,05$ ), e todos os grupos apresentaram peso final maior em relação ao peso inicial (Figura 6;  $p < 0,05$ ). Ratos submetidos ao ECMI, tratados ou não

com losartan, apresentaram menor peso corporal final em relação aos grupos controle e controle losartan (Figura 6;  $p < 0,05$ ).



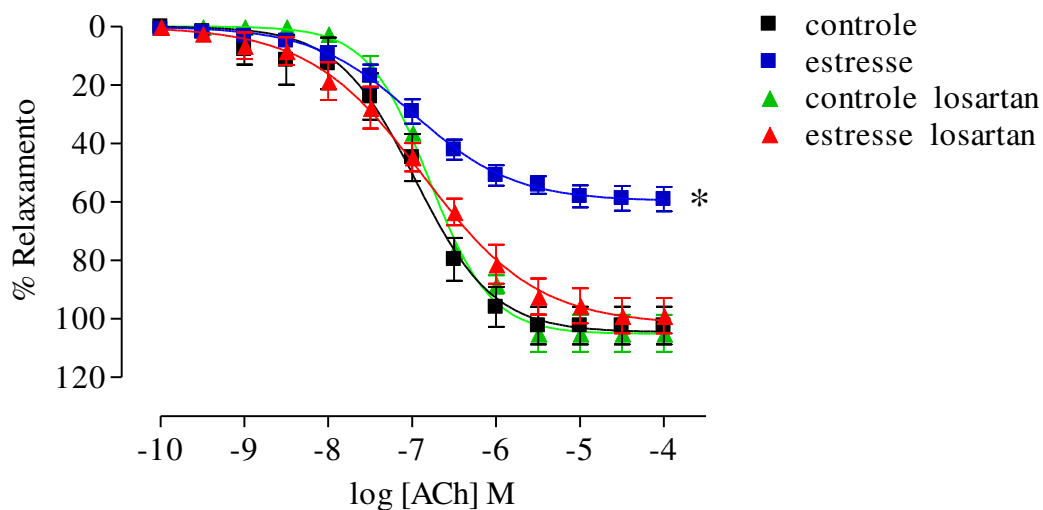
**Figura 6:** Peso corporal inicial e final dos grupos experimentais, determinado nas semanas 1 e 7 respectivamente. # Diferença significativa em relação ao peso inicial no mesmo grupo ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão \*Diferença estatística referente ao peso corporal final do respectivo grupo não submetido a estresse ( $p < 0,05$ ).  $N = 9$ /grupo.

Os dados referentes ao controle glicêmico estão representados na Figura 7. O grupo estresse apresentou maior área sob a curva glicêmica ( $885,2 \pm 10,07$  mmol x min/ L; Figura 7;  $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle ( $754,4 \pm 16,0$  mmol x min/ L;  $p < 0,05$ ), controle losartan ( $745,9 \pm 15,4$  mmol x min/ L) e estresse losartan ( $816,4 \pm 17,0$  mmol x min/ L;  $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa na resposta ao TTG entre os grupos controle losartan e estresse losartan (Figura 7;  $p > 0,05$ ).



**Figura 7:** Área sob a curva obtida a partir do teste de tolerância à glicose de animais controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão \*Diferença estatística em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). N= 7-9/grupo.

O ECMI reduziu a porcentagem de relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta torácica (estresse:  $59,15 \pm 4,17$  %) em relação ao grupo controle ( $102,3 \pm 6,45$  %;  $p < 0,05$ ; Figura 8). O tratamento com losartan cancelou este efeito, não tendo sido observada diferença significativa na resposta à acetilcolina entre os grupos estresse losartan ( $99,05 \pm 6,05$  %), controle losartan ( $105,1 \pm 6,34$  %) e controle ( $102,3 \pm 6,45$  %;  $p > 0,05$ ; Figura 8).



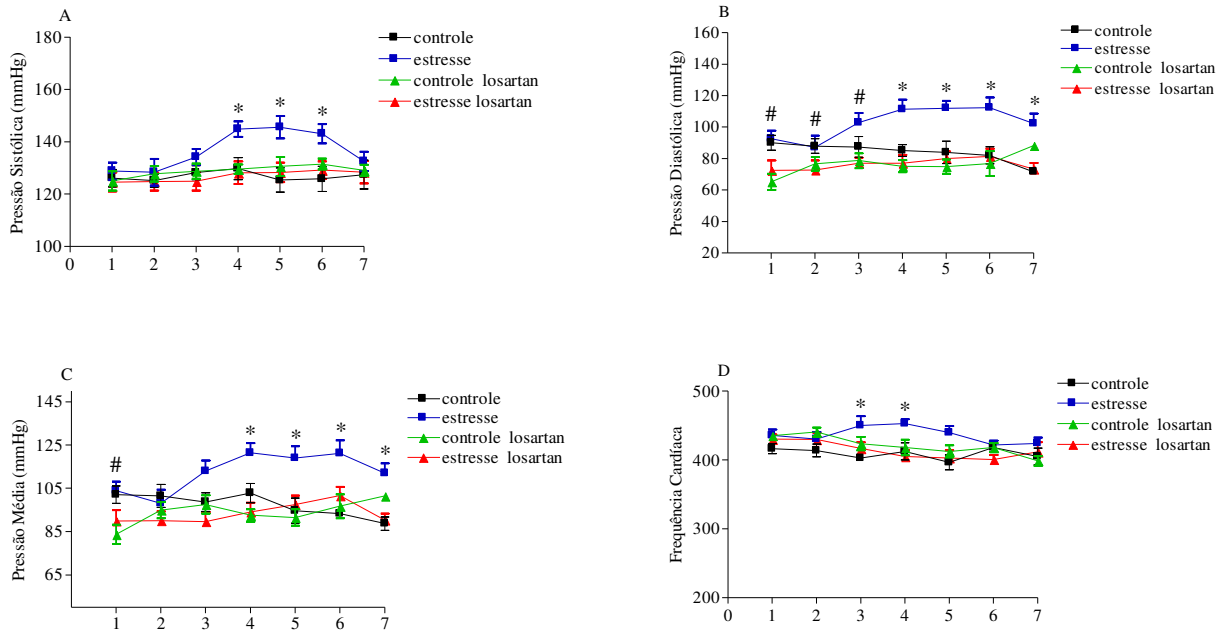
**Figura 8:** Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) obtidas em anéis pré-contraídos com fenilefrina, de aorta torácica isolada de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan. A resposta está expressa em porcentagem da pré-contracção induzida por fenilefrina ( $10^{-6}$ M). \*Diferença estatística em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). N = 6/grupo.

O grupo ECMI apresentou aumento significativo na pressão arterial sistólica (Figura 9A;  $p < 0,05$ ) e na pressão arterial média (Figura 9C;  $p < 0,05$ ), nas semanas 4, 5 e 6 comparado ao grupo controle, sem diferença estatística entre os grupos estresse losartan e controle losartan (Figura 9A e C;  $p > 0,05$ ). Na primeira semana, os grupos tratados com losartan apresentaram redução da pressão arterial média em relação aos respectivos animais não tratados com o losartan (Figura 9C;  $p < 0,05$ ).

No grupo ECMI houve aumento na pressão arterial diastólica nas semanas 4, 5, 6, e 7, em relação ao grupo controle (Figura 9B;  $p < 0,05$ ). Porém, não houve diferença significativa entre os grupos estresse losartan e controle losartan (Figura 9B;  $p > 0,05$ ). Nas semanas 1, 2 e 3, o tratamento com losartan diminuiu a pressão arterial diastólica nos grupos controle losartan e estresse losartan, quando comparados aos grupos controle e estresse, respectivamente (Figura 9B;  $p < 0,05$ ).

Nas semanas 3 e 4, o ECMI induziu aumento da frequência cardíaca em relação aos grupos controle, controle losartan e estresse losartan (Figura 9D;  $p < 0,05$ ), sem diferença entre os grupos controle losartan e estresse losartan (Figura 9D;  $p > 0,05$ ).





**Figura 9:** Valores basais de pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C) e de frequência cardíaca (bpm – batimentos por minuto) (D) de ratos controle ou submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível, tratados ou não com losartan. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão \*Diferença estatística do grupo estresse em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). # Diferença estatística dos grupos controle losartan e estresse losartan em relação aos grupos controle e estresse, respectivamente ( $p < 0,05$ ). N = 9-12/grupo.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que a disfunção endotelial, o aumento da pressão arterial e a diminuição da captação de glicose desencadeados pelo estímulo do ECMI em ratos, estão associados à ativação do SRA, e envolve a participação do receptor AT1, provavelmente via ligação da angiotensina II ao mesmo.

A eficiência do protocolo de estresse utilizado foi confirmada pelo menor ganho de peso e aumento nas concentrações sanguíneas de hormônios do estresse observado em ratos submetidos ao ECMI, em comparação com ratos controles. Já foi demonstrado, tanto em humanos como em modelos animais, que em resposta ao estímulo estressor, pode haver redução ou ganho do peso corporal (Retana-Márquez. *et al.*, 2003). Acredita-se que isso ocorra devido à estimulação  $\beta$ -adrenérgica, que favorece a lipólise (Kuo *et al.*, 2008; Ferreira, 2009) ou ao aumento do consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares (Dallman *et al.*, 2005), respectivamente. Em resposta ao estresse, há um redirecionamento da utilização de substratos energéticos, de forma seletiva, entre órgãos e tecidos que são inibidos ou estimulados (Houshyar *et al.*, 2004; Dallman *et al.*, 2005). Nesse contexto, ocorre mobilização de aminoácidos e ácidos graxos para a gliconeogênese hepática (Dallman *et al.*, 2005). Características do estresse, alterações no consumo alimentar, na secreção do hormônio do crescimento e na atividade da glândula da tireóide também poderiam estar envolvidos no efeito observado sobre o peso corporal (Dallman *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2008).

O aumento dos níveis circulantes de adrenalina, noradrenalina e corticosterona também confirmam a eficiência do protocolo de estresse utilizado e podem estar envolvidos no efeito observado sobre o peso corporal. As catecolaminas, liberadas na reação de estresse, aumentam o estado de alerta e inibem algumas funções neurovegetativas tais como comer e dormir (Chrousos & Gold, 1992; Tsigos & Chrousos, 2004). Além disto, as catecolaminas, por possuírem ação lipolítica, aumentam a hidrólise de triglicérides nos depósitos de tecido adiposo do organismo (Lafontan *et al.*, 2009) e estimulam diretamente a liberação de ácidos graxos e glicerol na corrente sanguínea, a partir de depósitos de gordura (Stoney, 2007), diminuindo significativamente a massa adiposa corporal (Bougnères *et al.*,

1997; Hauner, 1997; Black, 2003). Concomitante ao aumento dos níveis circulantes de catecolaminas, ao se comparar ao grupo controle, observou-se que o grupo submetido ao ECMI demonstrou elevação da concentração de corticosterona, hormônio que exerce um efeito permissivo às ações lipolíticas das catecolaminas (Brindley *et al.*, 1993; Black, 2002). Porém, como o objetivo da análise do peso corporal foi utilizá-lo como um indicador de estresse, não foram avaliados os mecanismos fisiológicos que podem estar envolvidos no menor ganho de peso corporal, o que faz parte de outro estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa.

As alterações desencadeadas pelo estresse crônico podem ser observadas após a retirada dos estressores. Com o objetivo de confirmar se 15 dias após finalizado o protocolo de ECMI, os animais ainda se encontravam estressados, no presente estudo foram determinadas as concentrações dos hormônios do estresse 1 e 15 dias após o ECMI. As maiores concentrações de corticosterona, noradrenalina e adrenalina circulantes observadas nestes períodos, no grupo submetido ao ECMI em comparação com o grupo controle, confirmam a efetividade do protocolo de estresse empregado e mostram que este protocolo experimental foi adequado para a análise dos efeitos em longo prazo, conforme descrito previamente por Neves *et al.* (2009).

As elevações dos níveis de corticosterona e catecolaminas induzem alterações cardiovasculares e metabólicas que visam permitir ao organismo adaptar-se ao estímulo estressor. Dentre estas, podem ser citadas o aumento do cronotropismo e inotropismo cardíaco, alterações do tônus vascular e liberação de substratos energéticos na corrente sanguínea (Roy *et al.*, 1998; Tanno & Marcondes, 2002; Luecken *et al.*, 2005). Porém, quando esses estímulos são mantidos por tempo prolongado, como em situações de estresse crônico, efeitos deletérios podem ser observados, tais como a ocorrência de intolerância à glicose, hiperglicemia, hipertensão arterial e dislipidemia, em médio ou longo prazo (Bjorhtorp, 1996; McCowen *et al.*, 2001; Marcondes *et al.*, 2011)

Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa evidenciou que a dislipidemia e o aumento na resposta vasoconstritora à fenilefrina, induzidos pelo ECMI, foram observadas 15 dias após o término do ECMI, tendo ocorrido, portanto, mesmo na ausência do estímulo estressor (Neves *et al.*, 2009). Em estudo mais recente, foi observado que a aplicação do

protocolo de ECMI reduziu a resposta vasodilatadora à acetilcolina e induziu aumento da camada íntima na aorta torácica de ratos (Neves *et al.*, 2011), indicando o desenvolvimento de disfunção endotelial. Estes efeitos também foram observados após finalizado o protocolo de estresse e foram acompanhados de desenvolvimento de resistência à insulina, evidenciado por aumento do índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) (Sondergaard *et al.*, 2006), e da área sob a curva no TTG, em ratos submetidos a ECMI em relação ao grupo não estressado (Neves *et al.*, 2011).

Como o aumento da atividade do SRA tem sido relacionado à ocorrência de resistência à insulina e disfunção endotelial (Cooper *et al.*, 2007), no experimento 1 do presente trabalho foi avaliada a atividade do SRA em ratos submetidos ao ECMI, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos nos efeitos vasculares e metabólicos induzidos pelo ECMI, descritos acima.

O aumento da atividade da ECA e renina circulantes em resposta ao estresse, verificado no presente estudo, está de acordo com os resultados obtidos por Grippo *et al.* (2005). Estes autores relataram que o estresse crônico desencadeou aumento significativo na atividade plasmática da renina. Chung *et al.* (2010) observaram aumento significativo nos níveis plasmáticos da ECA em ratos Sprague-Dawley estressados, os quais foram associados a aumento de estresse oxidativo, efeitos estes que poderiam contribuir para a ocorrência de alterações cardiovasculares.

O aumento da atividade da ECA tecidual pode estar relacionado a maior atividade simpática e aumento na concentração de catecolaminas plasmáticas (Muller & Luft, 1998; Hayashi & Kimoto, 2010), contribuindo para o aumento da pressão arterial e hipertensão (Sharifi *et al.*, 2004; Currie *et al.*, 2011). Apesar de a renina plasmática também ser secretada durante a ativação do sistema nervoso simpático e contribuir para a estimulação de respostas vasoconstritoras (Harrison-Bernard, 2009), no estudo de Hamer *et al.* (2011) não foi observada uma relação entre o estresse mental e o aumento da atividade da renina plasmática e da pressão arterial em indivíduos africanos. Entretanto, foi observada associação entre o aumento da atividade da renina plasmática e o aumento da espessura das camadas média e íntima da artéria carótida, o que é considerado um marcador da aterosclerose subclínica (Hamer *et al.*, 2011), relacionada diretamente ao processo de

disfunção endotelial (Neves *et al.*, 2009; Tomasoni *et al.*, 2010). Estes achados e o aumento na atividade da ECA e renina, observados no presente estudo, sugerem que a disfunção endotelial e a resistência à insulina induzidos pelo ECMI poderiam envolver aumento na atividade do SRA.

Acredita-se que as maiores complicações relacionadas à hiperatividade do SRA estejam associadas ao aumento das propriedades vasoconstritoras da angiotensina II (Saavedra *et al.*, 2005; Saavedra & Bernicky, 2007), bem como sua ação em promover aumento de radicais livres (Hsueh *et al.*, 2004).

A angiotensina II é produzida a partir da angiotensina I, por ação da ECA. Porém, além desta via clássica, outras duas vias de produção da angiotensina II também foram descritas. Este peptídeo pode ser sintetizado pela catepsina G, a partir da hidrólise direta do angiotensinogênio (De Resende & Mill, 2002), ou pode ser produzido pela clivagem da angiotensina I, por meio de uma serino-protease, denominada quimase (Ma *et al.*, 2010). No presente estudo, o aumento da atividade da renina, da ECA e da concentração de angiotensina II circulantes, juntamente com a não alteração da concentração sanguínea de angiotensina I, sugerem que o estresse estimulou as vias clássicas do SRA, e provavelmente a angiotensina I foi hidrolisada em angiotensina II pela ação da ECA (Chappell *et al.*, 1998).

Porém, a redução da concentração de angiotensina I induzida pelo ECMI também poderia ser explicada por sua utilização como substrato para a síntese de angiotensina (1-7). Por ação da ECA 2, a angiotensina I é convertida em angiotensina (1-9) e esta pode ser convertida em angiotensina (1-7) por ação da ECA. Além desta via, endopeptidases como a NEP, a PEP e a oligopeptidase também podem mediar a conversão direta da angiotensina I em angiotensina (1-7) (Ferrario, 2011).

Reconhecida como um antagonista endógeno de angiotensina II, a maioria das ações da angiotensina (1-7) acarretam diminuição da pressão arterial, contrabalanceando as ações constritoras, proliferativas, pró-fibróticas e pró-trombóticas da angiotensina II (Ferrario, 2011). Além disso, a angiotensina (1-7) participa do processo de modulação da liberação de vasopressina, potencializa os efeitos hipotensivos da bradicinina, estimula a síntese e a liberação de prostaglandinas vasodilatadoras e óxido nítrico (Ferrario & Iyer,

1998; Zimmerman, 2011). Assim, o aumento da angiotensina (1-7) pelo ECMI poderia representar um mecanismo de defesa para contrabalancear as ações da angiotensina II.

As ações clássicas da angiotensina II são mediadas pelo receptor AT<sub>1</sub> (Matsusaka & Ichikawa, 1997). No tecido vascular, a angiotensina II estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a biodisponibilidade de óxido nítrico e resultando em injúria vascular (Hsueh *et al.*, 2004). Inibidores da ECA e antagonistas de receptores de angiotensina previnem as complicações vasculares decorrentes de nefropatia e retinopatia no diabetes (McFarlane *et al.*, 2003).

As ações da angiotensina II, no tecido vascular, via receptor AT<sub>1</sub>, incluem também a ativação de moléculas de adesão, fatores de crescimento que modulam a migração de células inflamatórias para o espaço subendotelial (Zhou *et al.*, 2001; Goldstein & Sacalia, 2004). Na presença de hiperinsulinemia, a angiotensina II, endotelina e vasopressina potencializam a proliferação de células musculares lisas e endoteliais, no tecido vascular (Stenhouwer *et al.*, 1997). Além disso, evidências da participação da angiotensina II na etiologia da resistência à insulina foram obtidas nos estudos conduzidos com o modelo monogênico de hipertensão e resistência à insulina – o rato TG(mREN2)27 (Henriksen, 2007). Este animal desenvolve severos distúrbios cardiovasculares (hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca), apresenta elevada concentração tissular de angiotensina II e resistência à insulina em todo o organismo (Lee *et al.*, 1996; Blendea *et al.*, 2005; Henriksen, 2007).

Considerando as evidências sobre a relação entre disfunção endotelial, resistência à insulina e ações da angiotensina II, no experimento 2 foi investigada a participação deste peptídeo e do receptor AT<sub>1</sub> nos efeitos desencadeados pelo ECMI, por meio do bloqueio deste receptor pelo losartan.

Sabe-se que o SRA participa na regulação do balanço energético, entretanto, suas ações sobre o metabolismo ainda não estão bem esclarecidas (De Kloet *et al.*, 2011). Como citado e discutido no estudo 1, a diminuição do peso corporal é um dos indicadores de estresse. Assim, o resultado obtido no experimento 2 confirma que o protocolo de ECMI diminuiu o ganho de peso corporal nos animais estressados (grupos estresse e estresse losartan) em relação grupos não estressados (controle e controle losartan).

Embora o tratamento com o antagonista de receptor AT1 possa atenuar a redução de massa corporal induzida pela angiotensina II (Ortiz *et al.*, 2010) e o tratamento com o losartan possa inibir a diminuição do ganho de peso corporal em animais estressados por meio da imobilização (Chung *et al.*, 2010), acredita-se que no presente estudo, esse mesmo resultado não foi observado devido ao tipo de protocolo de estresse crônico utilizado, o qual é constituído por diferentes estímulos ao longo de 3 semanas consecutivas (Neves *et al.*, 2009).

Além de interferir no peso corporal, o estresse pode interferir no controle da glicemia. Sabe-se que o aumento na concentração de glicocorticóides é capaz de influenciar o metabolismo da glicose (McCowen *et al.*, 2001; Nowotny *et al.*, 2010), dificultar o controle glicêmico (Boyle *et al.*, 2007) e favorecer a disfunção endotelial (Toda & Toda, 2011).

No presente estudo foi observado um aumento significativo na glicemia do grupo submetido ao ECMI, comparado ao grupo controle, evidenciado pelo aumento da área sob a curva, no TTG, resultados que corroboram aqueles obtidos por Neves *et al.* (2011). Estes autores mostraram que a aplicação do mesmo protocolo de estresse, utilizado no presente trabalho, acarretou aumento da área sob a curva no TTG, além de maior concentração de insulina em jejum, aumento do índice aterogênico e prejuízo da função vascular de ratos Sprague-Dawley.

Elevados níveis de glicose e de ácidos graxos em resposta ao estresse, induzem resistência à insulina, estresse oxidativo e disfunção endotelial, principalmente pela piora nas vias de sinalização da insulina (Raikkonen *et al.*, 1996; Black, 2003). Nesse contexto, estudos mostram que fármacos antihipertensivos podem melhorar a função endotelial por vias enzimáticas e não enzimáticas, incluindo inibidores da ECA e antagonistas de receptor AT1 que, dentre outras funções, favorecem a liberação e o efeito vasodilatador do óxido nítrico (Chung *et al.*, 2010; Mizuno *et al.*, 2010). Como a administração do losartan cancelou os efeitos hiperglicêmicos do estresse no experimento 2, os dados do presente estudo mostram que o aumento da área sob a curva no TTG era mediado pela angiotensina II, via receptor AT1, e sugerem o seu envolvimento na resistência à insulina induzida pelo ECMI, descrita por Neves *et al.* (2011).

Inibidores do SRA são utilizados para melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina por desencadearem vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da microcirculação nos músculos esqueléticos, facilitando o transporte da glicose em tecidos dependentes da ação da insulina (Scheen, 2004), e prevenindo o desenvolvimento de complicações renais em pacientes diabéticos e/ou hipertensivos (Tocci & Volpe, 2011). Além disso, a melhora na sensibilidade à insulina pelo tratamento com bloqueadores de receptor AT1 está relacionada à diminuição da estimulação do sistema nervoso simpático e redução da liberação de noradrenalina (Aksnes *et al.*, 2008). Uresin *et al.* (2004), confirmaram que a ativação do sistema nervoso simpático pelo estresse crônico desencadeou elevação da glicemia em ratos Wistar. Entretanto, após o tratamento com o antagonista de receptor AT1, losartan, esses efeitos foram revertidos, sugerindo que o uso desse fármaco pode diminuir o excesso da atividade simpática causada pelo estresse e, assim, prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e do diabetes tipo II. Também foi proposto que o papel preventivo do bloqueio de receptores AT1 na ocorrência do diabetes pode estar relacionado à sua função de auxiliar no recrutamento e diferenciação de adipócitos, bem como na atenuação da deposição de lipídios em tecidos como músculos, fígado ou pâncreas, melhorando a sensibilidade à insulina (Boden, 2002; Lewis *et al.*, 2002; Scheen *et al.*, 2004).

A resistência à insulina pode resultar em disfunção endotelial em vasos periféricos e coronarianos (Hsueh *et al.*, 2003; De Carvalho *et al.*, 2006). Como descrito anteriormente, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que o ECMI também induz disfunção endotelial (Neves *et al.* 2009; 2011). O termo disfunção endotelial tem sido amplamente utilizado para se referir à piora no mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio. Dentre as principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, destaca-se o óxido nítrico, o qual é gerado a partir do aminoácido L-arginina pela óxido nítrico sintase endotelial. Sua produção pode ser estimulada pelo fluxo sanguíneo (por força de cisalhamento) através da superfície celular endotelial ou por mediadores químicos, como a acetilcolina, capazes de estimularem receptores presentes na membrana celular endotelial. Por este motivo, alterações relacionadas à piora no relaxamento



endotelial podem ser avaliadas por meio da redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina (John & Schmieder, 2000), como parâmetro este analisado no presente estudo.

Os resultados no presente trabalho mostram que a angiotensina II parece estar envolvida na disfunção endotelial induzida pelo ECMI uma vez que o tratamento com antagonista do receptor AT1 cancelou a redução na resposta vasodilatadora à acetilcolina em aorta torácica isolada de ratos estressados em relação ao grupo controle. O envolvimento da angiotensina II e do receptor AT1 na disfunção endotelial também foi observado por outros autores. Zhang *et al.* (2009) observaram que a exposição de ratos Sprague-Dawley a um modelo de microgravidade induziu aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina, diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina e aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase e da produção de ânions superóxido em artérias cerebrais e carótidas. A maior expressão da óxido nítrico sintase associada a aumento da produção de radicais livres foi referida como desacoplamento desta enzima na vasculatura (Zalba *et al.*, 2001) e está associada a estresse oxidativo e disfunção vascular. Estas respostas foram parcialmente revertidas pelo tratamento com losartan.

Como mencionado, sabe-se que fisiologicamente o endotélio desempenha um papel crucial no controle do tônus vascular por sua habilidade em produzir tanto fatores relaxantes quanto constritores. Desta forma, mudanças na reatividade vascular que envolvam o músculo liso e células endoteliais podem ter participação no desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão arterial (Luscher *et al.*, 1988; Linder & Bendhack, 2002; Mitchell *et al.*, 2004). Considerando que a disfunção endotelial e a resistência à insulina induzida pelo ECMI poderiam resultar em aumento da resistência periférica, no presente estudo, foram também avaliados os efeitos do ECMI sobre a pressão arterial e frequência cardíaca *in vivo*.

O aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, observado a partir da segunda semana do protocolo de ECMI, sugere que o efeito pressórico do ECMI pode estar relacionado ao aumento da resistência periférica total, e não à estimulação simpática do cronotropismo cardíaco. Esta interpretação está baseada no fato de que a pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica mantiveram-se elevadas até uma ou duas semanas após o ECMI, respectivamente, enquanto a frequência cardíaca apresentou elevação somente nas

duas primeiras semanas de aplicação do protocolo de estresse. Considerando os efeitos vasculares do ECMI descritos anteriormente, o aumento da resistência periférica poderia ser desencadeado pela disfunção endotelial e resistência à insulina observada em ratos do grupo estressado, quando comparados a animais controle. Além disto, a ausência de alteração da pressão arterial em ratos submetidos ao ECMI e tratados com losartan indicam a provável participação da angiotensina II, via receptor AT1, nos efeitos pressóricos desencadeados pelo estresse. Estes resultados estão de acordo com Chung *et al.* (2010), que observaram que o estresse crônico por imobilização, em ratos, causa elevação da pressão arterial sistólica, e esta, pode ser revertida por inibidores da ECA ou de antagonistas de receptores AT1 (Chung *et al.*, 2010).

A relação entre aumento da pressão arterial e maior produção de angiotensina II parte do pressuposto que esse peptídeo pode aumentar a resposta vasoconstritora aos estímulos simpáticos por meio de uma maior expressão de receptores de catecolaminas e também por sua ação estimulatória sobre a síntese e a liberação de noradrenalina (Zimmerman, 1981; Balt *et al.*, 2001; Abdulla *et al.*, 2011), além das ações vasoconstritoras próprias da angiotensina II.

Em humanos foi relatado que o estresse mental promove aumento dos valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca, bem como aumento da resistência periférica em indivíduos com hipertensão arterial essencial em relação aos valores basais. O tratamento com antagonistas de receptores de AT1 diminuiu significativamente os níveis pressóricos, demonstrando também a possível participação da angiotensina II nas respostas ao estresse mental em humanos (Arosio *et al.*, 2005).

Considerando os dados presentes na literatura que demonstram as alterações desencadeadas pelo estresse crônico, associados aos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que a aplicação do protocolo de ECMI levou ao processo de disfunção endotelial em ratos, evidenciado pela diminuição do relaxamento dependente do endotélio na aorta torácica induzido pela acetilcolina, aumento na pressão arterial *in vivo* e intolerância à glicose. Estes efeitos mostraram-se associados à hiperatividade SRA, e foram cancelados pelo tratamento com losartan. Estes resultados mostram, portanto, que alterações acima descritas desencadeadas pelo ECMI são provavelmente mediadas pela

ligação da angiotensina II ao receptor AT1, e esclarecem parte dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas alterações metabólicas e cardiovasculares decorrentes do estresse crônico.

Dessa forma, há grande importância de continuidade desse estudo para avaliar a participação do SRA sistêmico e do tissular na fisiopatologia das complicações observadas. Para essa finalidade, torna-se fundamental a utilização de animais em pesquisa, trazendo como perspectiva o entendimento detalhado desse processo, o que poderá auxiliar no tratamento de indivíduos que sofrem de comorbidade relativa ao estresse.

## **7. CONCLUSÕES**

O presente estudo demonstrou que o estresse crônico moderado e imprevisível promove aumento atividade do Sistema Renina-Angiotensina e que a angiotensina II parece estar envolvida, via receptor AT1, nas alterações induzidas por este estímulo sobre o controle da glicemia, reatividade vascular e a pressão arterial, em ratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Abdulla MH, Sattar MA, Abdullah NA, Khan MA, Anand Swarup KR, Johns EJ. The effect of losartan and carvedilol on vasopressor responses to adrenergic agonists and angiotensin II in the systemic circulation of Sprague Dawley rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2011; 31(1-2): 13-20
- Aguilera G, Kiss A, Luo X, Akbasak BS. The renin angiotensin system and the stress response. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 771:173-86.
- Aksnes TA, Flaa A, Sevre K, Mundal HH, Rostrup M, Kjeldsen SE. Effects on plasma noradrenaline may explain some of the improved insulin sensitivity seen by AT-1 receptor blockade. *Blood Press.* 2008; 17(3): 156-63.
- Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci (Lond).* 1999; 96(5):513-23.
- Aronson D, Mittleman MA, Burger AJ. Measures of heart period variability as predictors of mortality in hospitalized patients with decompensated congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 2004; 93(1): 59-63.
- Arosio E, De Marchi S, Prior M, Rigoni A, Lechi A. Haemodynamic effects of eprosartan and valsartan in hypertensive patients during isometric and mental stress. *J Hypertens.* 2005; 23(10): 1923-7
- Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010. Doi:10.1155/2010/802078
- Balt JC, Mathy MJ, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Inhibition of angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the pithed rat: a comparison between losartan, irbesartan, telmisartan, and captopril. *J Hypertens.* 2001; 19(3): 465-73.
- Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295(2): 381-7.
- Björntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996; 20(4): 291-302.

\*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do International Comittee of Medical Journal Editors - grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Black PH. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun.* 2002; 16(6): 622-53
- Black PH. The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behav Immun.* 2003; 17(5): 350-64.
- Blendea MC, Jacobs D, Stump CS, McFarlane SI, Ogrin C, Bahtyiar G *et al.* Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288(2): 353-9.
- Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002; 5(5): 545-9.
- Bougnères P, Stunff CL, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J Clin Invest.* 1997; 99(11): 2568-73.
- Boyle SH, Surwit RS, Georgiades A, Brummett BH, Helms MJ, Williams RB, Barefoot JC. Depressive symptoms, race, and glucose concentrations: the role of cortisol as mediator. *Diabetes Care.* 2007; 30(10) :2484-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Braga AN, da Silva Lemos M, da Silva JR, Fontes WR, dos Santos RA. Effects of angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282(6): 1663-71.
- Brindley DN, McCann BS, Niaura R, Stoney CM, Suarez EC. Stress and lipoprotein metabolism: modulators and mechanisms. *Metabolism.* 1993; 42(9 Suppl 1): 3-15.
- Brotman DJ, Golden SH, Wittstein IS. The cardiovascular toll of stress. *Lancet.* 2007; 370(9592): 1089-100.
- Cagampang FR, Poore KR, Hanson MA. Developmental origins of the metabolic syndrome: body clocks and stress responses. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(2): 214-20.
- Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003; 24(3): 261-71.
- Carmona, AK. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz. J Med. Res.* 2005; 38(6): 861-868.

- Chandola T, Britton A, Brunner E, Hemingway H, Malik M, Kumari M, Badrick E, Kivimaki M, Marmot M. Work stress and coronary heart disease: what are the mechanisms? *Eur Heart J*. 2008; 29(5): 640-8.
- Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 1998; 31(1 Pt 2): 362-7.
- Chiodini I, Torlontano M, Scillitani A, Arosio M, Bacci S, Di Lembo S. Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients. *Eur J Endocrinol*. 2005; 153(6): 837-44.
- Chiodini I, Adda G, Scillitani A, Coletti F, Morelli V, Di Lembo S. *et al*. Cortisol secretion in patients with type 2 diabetes: relationship with chronic complications. *Diabetes Care*. 2007; 30(1): 83-8.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992; 267(9):1244-52.
- Chumaeva N, Hintsanen M, Ravaja N, Puttonen S, Heponiemi T, Pulkki-Råback L, *et al*. Interactive effect of long-term mental stress and cardiac stress reactivity on carotid intima-media thickness: the Cardiovascular Risk in Young Finns study. *Stress*. 2009; 12(4): 283-93.
- Chung IM, Kim YM, Yoo MH, Shin MK, Kim CK, Suh SH. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis*. 2010; 213(1): 109-14.
- Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C *et al*. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(4): 2009-23.
- Cunha TS, Farah V, Paulini J, Pazzine M, Elased KM, Marcondes FK *et al*. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. *Regul Pept*. 2007; 139(1-3): 1-4.
- Currie G, Freel EM, Perry CG, Dominiczak AF. Disorders of blood pressure regulation-role of catecholamine biosynthesis, release, and metabolism. *Curr Hypertens Rep*. 2011. Doi: 10.1007/s11906-011-0239-2
- Da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio & doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2005.
- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U *et al*. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002; 359(9311): 995-1003.

- Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun.* 2005;19(4): 275-80.
- Daugherty A, Poduri A, Chen X, Lu H, Cassis LA. Genetic variants of the Renin Angiotensin system: effects on atherosclerosis in experimental models and humans. *Curr Atheroscler Rep.* 2010; 12(3): 167-73.
- De Carvalho MH, Colaço AL, Fortes ZB. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50(2): 304-12.
- De Kloet AD, Krause EG, Kim DH, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology.* 2009; 150(9): 4114-23.
- De Kloet AD, Krause EG, Scott KA, Foster MT, Herman JP, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. Central angiotensin II has catabolic action at white and brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301(6): 1081-91.
- De Resende MM, Mill JG. Vias Alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78 (4): 425-31.
- Di Marco GS, Naffah-Mazzacoratti Md Mda G, Vio CP, Dos Santos OF, Schor N, Casarini DE. Mesangial cells are able to produce catecholamines in vitro. *J Cell Biochem.* 2003; 89(1): 144-51.
- 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; 87(5): E 1-9.
- Duque FLV. Aterosclerose: Aterogênese e fatores de risco. *Revista de Angiologia e Cirurgia Cardiovascular.* 1998; 7: 50-58.
- Dumont EC, Rafrafi S, Laforest S, Drolet G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience.* 1999; 93(3): 877-84.
- Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC. Stress hyperglycaemia. *Lancet.* 2009; 373(9677): 1798-807.
- Epifanio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade]. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 84(1): 10-4.
- Esler M, Kaye D. Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35(7 Suppl 4): 1-7.



- Feng GG, Yamada M, Wongsawatkul O, Li C, Huang L, An J et al. Role of naofen, a novel WD repeated-containing protein, in reducing nitric-oxide-induced relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35(12): 1447-53.
- Ferrario CM, Iyer SN. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept.* 1998; 78(1-3): 13-8.
- Ferrario CM. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011; 20(1): 1-6.
- Ferreria R. Efeito do estresse crônico e de dieta hipercalórica sobre o peso corporal e metabolismo de ratos [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
- Flaa A, Sandvik L, Kjeldsen SE, Eide IK, Rostrup M. Does sympathoadrenal activity predict changes in body fat? An 18-y follow-up study. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(6): 1596-601.
- Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. New fACEs to the renin-angiotensin system. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 91-5.
- Friedland J, Silverstein EA sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol.* 1976; 66(2):416-24.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264(3): 224-36.
- Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2563-8.
- Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress.* 2007; 10(2):109-20.
- Gonzalez-Bono E, Rohleder N, Hellhammer DH, Salvador A, Kirschbaum C. Glucose but not protein or fat load amplifies the cortisol response to psychosocial stress. *Horm Behav.* 2002; 41(3): 328-33.
- Grassi-Oliveira R, Ashy M, Stein LM. Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr.* 2008; 30(1): 60-8.
- Greci LS, Kailasam M, Malkani S, Katz DL, Hulinsky I, Ahmadi R, Nawaz H. Utility of HbA(1c) levels for diabetes case finding in hospitalized patients with hyperglycemia. *Diabetes Care.* 2003; 26(4):1064-8.
- Grippe A, Johnson AK. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. *Neurosci. Rev.* 2002; 26: 941-962.
- Grippe AJ, Beltz TG, Johnson AK. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav.* 2003; 78(4-5): 703-10.

- Grippe A.; Francis J.; Beltz, TG, Felder RB, Johnson AK. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiology & Behavior*. 2005; 84: 697-706.
- Grisk O, Rettig R. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(2): 238-46.
- Groeschel M, Braam B. Connecting chronic and recurrent stress to vascular dysfunction: no relaxed role for the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300(1): 1-10.
- Hamer M, Malan L, Schutte AE, Huisman HW, van Rooyen JM, Schutte R *et al*. Plasma renin responses to mental stress and carotid intima-media thickness in black Africans: the SABPA study. *J Hum Hypertens*. 2011; 25(7): 437-43.
- Han SH, Quon MJ, Koh KK. Reciprocal relationships between abnormal metabolic parameters and endothelial dysfunction. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18(1): 58-65.
- Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ*. 2009; 33(4): 270-4.
- Hauer H. Obesity and diabetes potential for intervention? *Endocrinol*. 1997; 155(2): 223.
- Hayashi A, Kimoto K. Studies on the mechanism of antihypertensive action by nicotianamine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010; 56(4): 242-6.
- Henriksen EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 293(3): 974-80.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091): 87-91.
- Houshyar H, Manalo S, Dallman MF. Time-dependent alterations in mRNA expression of brain neuropeptides regulating energy balance and hypothalamo-pituitary-adrenal activity after withdrawal from intermittent morphine treatment. *J Neurosci*. 2004; 24(42): 9414-24.
- Hsueh WA, Lyon CJ, Quiñones MJ. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med*. 2004; 117(2): 109-17.
- Hurst JW, Logue, RB, Schlant RC, Wenger NK. *The heart: Arteries and veins* 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1978 *apud* Krantz DS, Manuck SB. Acute psychophysiological reactivity and risk of cardiovascular disease: a review and methodologic critique. *Psychol Bull*. 1984; 96(3): 435-64.
- Inagami T. A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. *Hypertension*. 1998; 32(6): 953-7.

- John S, Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens.* 2000; 18(4): 363-74.
- Johansen D, Stocks T, Jonsson H, Lindkvist B, Björge T, Concin H *et al.* Metabolic factors and the risk of pancreatic cancer: a prospective analysis of almost 580,000 men and women in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(9): 2307-17.
- Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J.* 2009; 276(20): 5747-54.
- Kim MC, Kim CS, Chung TH, Park HO, Yoo CI. Metabolic syndrome, lifestyle risk factors, and distal colon adenoma: A retrospective cohort study. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(35): 4031-7.
- Kjeldsen S.E., Moan A., Petrin J., Weder A.B., Julius S. Effects of increased arterial epinephrine on insulin, glucose and phosphate. *Blood press.* 1996; 5(1): 27-31.
- Kluger J, Cody RJ, Laragh JH. The contributions of sympathetic tone and the renin-angiotensin system to severe chronic congestive heart failure: response to specific inhibitors (prazosin and captopril). *Am J Cardiol.* 1982; 49(7): 1667-74
- Krantz DS, Manuck SB. Acute psychophysiologic reactivity and risk of cardiovascular disease: a review and methodologic critique. *Psychol Bull.* 1984; 96(3): 435-64.
- Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension.* 1995; 25(5): 1111-5.
- Kudielka BM, Wüst S. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. *Stress.* 2010; 13(1): 1-14.
- Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, *et al.* Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med.* 2007; 13(7): 803-11.
- Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnanský R, Zukowska Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1148: 232-7.

- La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*. 1998; 351(9101): 478-84.
- Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*. 2009; 48(5): 275-97.
- Lardizabal JA, Deedwania PC. The role of rennin - angiotensin agents in altering the natural history of type 2 diabetes mellitus. *Curr Cardiol Rep*. 2010; 12(6): 464-71.
- Le Moal M. Historical approach and evolution of the stress concept: a personal account. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32 Suppl 1: 3-9.
- Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *Am J Physiol*. 1996; 270(6 Pt 1): 919-29.
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002; 23(2): 201-29.
- Li JB, Wang X, Zhang JX, Gu P, Zhang X, Chen CX, *et al*. Metabolic syndrome: prevalence and risk factors in southern China. *J Int Med Res*. 2010; 38(3): 1142-8.
- Liang Y, Osborne MC, Monia BP, Bhanot S, Watts LM, She P *et al*. Antisense oligonucleotides targeted against glucocorticoid receptor reduce hepatic glucose production and ameliorate hyperglycemia in diabetic mice. *Metabolism*. 2005; 54(7): 848-55.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995; 270(1): 319-24.
- Linder AE, Bendhack LM. Endothelin-1-induced contraction is impaired in the tail artery of renal hypertensive rats. *Vascul Pharmacol*. 2002; 39(1-2): 77-82.
- Lois K, Kumar S. Obesity and diabetes. *Endocrinol Nutr*. 2009; 56S4: 38-42.
- Loria AS, Pollock DM, Pollock JS. Early life stress sensitizes rats to angiotensin II-induced hypertension and vascular inflammation in adult life. *Hypertension*. 2010; 55(2): 494-9.
- Loures DL, Sant Anna I, Baldotto CS, Sousa EB, Nóbrega AC. Mental stress and cardiovascular system. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 78(5): 525-30.
- Luecken LJ, Rodriguez AP, Appelhans BM. Cardiovascular stress responses in young adulthood associated with family-of-origin relationship experiences. *Psychosom Med*. 2005; 67(4): 514-21.
- Luft FC. New insights into angiotensin, reactive oxygen and endothelial function. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25(7): 2099-101.

- Lüscher TF, Diederich D, Weber E, Vanhoutte PM, Bühler FR. Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1988; 11(6 Pt 2): 573-8.
- Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol*. 2010; 160(6): 1273-92.
- Marcondes FK, Neves VJ, Costa R, Sanches A, Cunha TS, Moura MJ, *et al*. Dyslipidemia induced by stress. In: *Dyslipidemia*. Rijeka: Roya Kelishadi; 2011.
- Matsusaka T, Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol*. 1997; 59: 395-412.
- Mayorov DN. Brain angiotensin AT1 receptors as specific regulators of cardiovascular reactivity to acute psychoemotional stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011; 38(2): 126-35
- McCowen KC, Malhotra L, Bistrrian BR. Stress-induced hyperglycemia. *Crit Care Clin*. 2001; 17(1): 107-24.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8(4): 367-81.
- McEwen BS, Gianaros PJ. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu Rev Med*. 2011; 62: 431-45.
- McFarlane SI, Kumar A, Sowers JR. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2003; 91(12A): 30-37.
- McGrady A. The effects of biofeedback in diabetes and essential hypertension. *Cleve Clin J Med*. 2010; 77 Suppl 3: 68-71.
- Mello AF, Mello MF, Carpenter LL, Price LH. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003; 25(4):231-8.
- Mertens B, Vanderheyden P, Michotte Y, Sarre S. The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010; 11(1): 49-56.
- Mezzacappa ES, Kelsey RM, Katkin ES, Sloan RP. Vagal rebound and recovery from psychological stress. *Psychosom Med*. 2001; 63(4): 650-7.
- Mitchell BM, Dorrance AM, Ergul A, Webb RC. Sepiapterin decreases vasorelaxation in nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43(1): 93-8.
- Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. Advances in pharmacologic modulation of nitric oxide in hypertension. *Curr Cardiol Rep*. 2010; 12(6): 472-80.
- Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010. Doi:10.1155/2010/289645

- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Perrin S, Haefely WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT<sub>1C</sub> receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993; 110(1-2): 140-4.
- Moreau J.L. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale*. 1997; 23(4): 280-289.
- Moura MJ, Marcondes FK. Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci*. 2001; 68(8): 881-8.
- Müller DN, Luft FC. The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic Res Cardiol*. 1998; 93 Suppl 2: 7-14.
- Müller B. Endocrine aspects of critical illness. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2007; 68(4): 290-8.
- Nadir MA, Wei L, Elder DH, Libianto R, Lim TK, Pauriah M *et al*. Impact of renin-angiotensin system blockade therapy on outcome in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(6): 570-6.
- Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R *et al*. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress*. 2009; 12(4): 320-327.
- Neves VJ, Moura MJ, Almeida BS, Costa R, Sanches A, Ferreira R, *et al*. Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. *Stress*. 2011 [in press]. Doi: 10.3109/10253890.2011.601369).
- Nowotny B, Cavka M, Herder C, Löffler H, Poschen U, Joksimovic L, *et al*. Effects of acute psychological stress on glucose metabolism and subclinical inflammation in patients with post-traumatic stress disorder. *Horm Metab Res*. 2010; 42(10): 746-53.
- Oigman W, Neves MFT. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens*. 2000; 3: 261-7.
- Ortiz RM, Kobori H, Conte D, Navar LG. Angiotensin II-induced reduction in body mass is Ang II receptor mediated in association with elevated corticosterone. *Growth Horm IGF Res*. 2010; 20(4): 282-8.
- Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1987; 49: 413-35.
- Phillips MI, De Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med (Berl)*. 2008; 86(6): 715-22.
- Pialoux V, Foster GE, Ahmed SB, Beaudin AE, Hanly PJ, Poulin MJ. Losartan abolishes oxidative stress induced by intermittent hypoxia in humans. *J Physiol*. 2011; 589 (22): 5529-37.

- Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Pagan J, Kobori H, Seth DM, Casarini DE *et al.* Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*. 2008; 51(6): 1590-6.
- Pyykkönen AJ, Räikkönen K, Tuomi T, Eriksson JG, Groop L, Isomaa B. Stressful life events and the metabolic syndrome: the prevalence, prediction and prevention of diabetes (PPP)-Botnia Study. *Diabetes Care*. 2010; 33(2): 378-84.
- Rabin B. Stress: A System of the Whole. *Psychoneuroimmunology*. 2007; 2: 709-22.
- Räikkönen K, Keltikangas-Järvinen L, Adlercreutz H, Hautanen A. Psychosocial stress and the insulin resistance syndrome. *Metabolism*. 1996; 45(12): 1533-8.
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domínguez-Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28(2): 207-27.
- Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009; 84(21-22): 705-12.
- Ronchi, F.A. Associação das isoformas da enzima conversora de angiotensina I (ECA) a disfunções dos sistemas renal e pancreático no diabetes melito em ratos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR) [tese]. São Paulo: UNIFESP; 2006.
- Roy MP, Steptoe A, Kirschbaum C. Life events and social support as moderators of individual differences in cardiovascular and cortisol reactivity. *J Pers Soc Psychol*. 1998; 75(5): 1273-81.
- Roy A.M.P.; Kirschbaum B.C.; Steptoe C.A. Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinology*. 2001; 26: 375-391.
- Rubinstein MR, Cremaschi GA, Oliveri LM, Gerezi EN, Wald MR, Genaro AM. Possible involvement of stress hormones and hyperglycaemia in chronic mild stress-induced impairment of immune functions in diabetic mice. *Stress*. 2010; 13(5): 384-91.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S *et al.* Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 2001; 38(6): 1382-7.
- Saavedra JM, Ando H, Armando I, Baiardi G, Bregonzio C, Juorio A *et al.* Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul Pept*. 2005; 128(3): 227-38.

- Saavedra JM, Benicky J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress*. 2007; 10(2): 185-93.
- Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs*. 2004; 64(22): 2537-65.
- Seematter G, Guenat E, Schneiter P, Cayeux C, Jéquier E, Tappy L. Effects of mental stress on insulin-mediated glucose metabolism and energy expenditure in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 ;279(4): 799-805.
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936; 138(1): 32.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002; 51(12): 3391-9.
- Sharifi AM, Akbarloo N, Darabi R, Larijani B. Study of correlation between elevation of blood pressure and tissue ACE activity during development of hypertension in 1K1C rats. *Vascul Pharmacol*. 2004; 41(1): 15-20.
- Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*. 1997; 100(2): 264-9.
- Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A *et al*. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2010; 9(12): 830-4.
- Søndergaard LG, Stoltenberg M, Doering P, Flyvbjerg A, Rungby J. Zinc ions in the endocrine and exocrine pancreas of zinc deficient rats. *Histol Histopathol*. 2006; 21(6): 619-25
- 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; 28(8): 1761-9.
- Stein PK, Kleiger RE. Insights from the study of heart rate variability. *Annu Rev Med*. 1999; 50: 249-61.
- Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res*. 1997; 34(1): 55-68.
- Stoney, C.M. Cholesterol and Lipoproteins, In: George Fink, editor. *Encyclopedia of Stress*. San Diego: Elsevier; 2007. p. 478-483.
- Sun MW, Zhong MF, Gu J, Qian FL, Gu JZ, Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res*. 2008; 31(4): 805-16.
- Tanno AP, Marcondes FK. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *RBCF*. 2002; 38(3): 273-289.



- Tikellis C, Cooper ME, Thomas MC. Role of the renin-angiotensin system in the endocrine pancreas: implications for the development of diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(5-6): 737-51.
- 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; 275(43): 33238-43.
- Tocci G, Volpe M. End-organ protection in patients with hypertension: focus on the role of Angiotensin receptor blockers on renal function. *Drugs.* 2011; 71(8): 1003-17.
- Toda N, Nakanishi-Toda M. How mental stress affects endothelial function. *Pflugers Arch.* 2011; 462(6): 779-94.
- Tomasoni L, Sitia S, Borghi C, Cicero AF, Ceconi C, Cecaro F *et al.* Effects of treatment strategy on endothelial function. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(12): 840-4.
- Trindade DC, Trindade RC, Marassi MP, Martins OP, Costa-e-Sousa RH, Mattos EC *et al.* Role of renin-angiotensin system in development of heart failure induced by myocardial infarction in rats. *An Acad Bras Cienc.* 2007; 79(2): 251-9.
- Tsigos C, Kyrou I, Chrousos GP. Stress, endocrine manifestations and diseases. In: Cooper CL, editor. *Handbook of Stress Medicine and Health.* 2. ed. CRC press; 2004. p. 101-129.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291(5): 965-73.
- Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkök E, Gürol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004; 5(2): 93-6.
- Ursin H, Eriksen HR. The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2004; 29(5): 567-92.
- Van Cromphaut SJ. Hyperglycaemia as part of the stress response: the underlying mechanisms. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2009; 23(4): 375-86.
- Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med (Berl).* 2008; 86(6): 663-71.
- Wallander M, Malmberg K, Norhammar A, Rydén L, Tenerz A. Oral glucose tolerance test: a reliable tool for early detection of glucose abnormalities in patients with acute myocardial infarction in clinical practice: a report on repeated oral glucose tolerance tests from the GAMI study. *Diabetes Care.* 2008 Jan; 31(1): 36-8.

- Wichi RB, Farah V, Chen Y, Irigoyen MC, Morris M. Deficiency in angiotensin AT1a receptors prevents diabetes-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292(3): 1184-9.
- Wiesli P, Schmid C, Kerwer O, Nigg-Koch C, Klaghofer R, Seifert B, *et al.* Acute psychological stress affects glucose concentrations in patients with type 1 diabetes following food intake but not in the fasting state. *Diabetes Care.* 2005; 28(8): 1910-5.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 1997; 134(4): 319-29.
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 2005; 52(2): 90-110.
- Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol.* 1992; 140(1): 95-107.
- Wood GE, Shors TJ. Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(7): 4066-71
- Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC Jr, Kasi VS, *et al.*, Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol.* 2004; 165(3): 1019-32.
- Yilmaz MI, Sonmez A, Caglar K, Celik T, Yenicesu M, Eyiletlen T *et al.* Effect of antihypertensive agents on plasma adiponectin levels in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Nephrology (Carlton).* 2007; 12(2): 147-53.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ *et al.* Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001; 38(6): 1395-9.
- Zhang R, Bai YG, Lin LJ, Bao JX, Zhang YY, Tang H *et al.* Blockade of AT1 receptor partially restores vasoreactivity, NOS expression, and superoxide levels in cerebral and carotid arteries of hindlimb unweighting rats. *J Appl Physiol.* 2009; 106(1): 251-8.
- Zimmerman BG. Adrenergic facilitation by angiotensin: does it serve a physiological function? *Clin Sci.* 1981; 60: 343-348 *apud* Arosio E, De Marchi S, Prior M, Rigoni A, Lechi A. Haemodynamic effects of eprosartan and valsartan in hypertensive patients during isometric and mental stress. *J Hypertens.* 2005; 23(10): 1923-7.
- Zimmerman MC. Angiotensin II and angiotensin-1-7 redox signaling in the central nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; 11(2): 138-43.

- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001; 108(8): 1167-74.
- Zorad S, Dou JT, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J *et al.* Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypertrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol.* 2006; 552(1-3): 112-22.

## ANEXO 1 – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

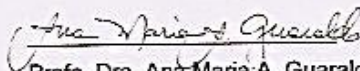
#### CERTIFICADO

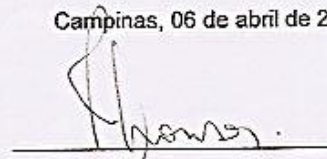
Certificamos que o Protocolo nº **1829-1**, sobre "**Participação do sistema renina-angiotensina nas alterações vasculares e metabólicas induzidas por estresse crônico e dieta hipercalórica em ratos**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de abril de 2009**.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1829-1**, entitled "**Role of angiotensin renin system in the vascular and metabolic changes induced by chronic stress and hypercaloric diet in rats**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 6, 2009**.

Campinas, 06 de abril de 2009.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>