

GISELE CRISTIANE VAZ

Efeito da ativação de núcleos hipotalâmicos na absorção de glicose
e sódio em ratos submetidos à perfusão jejunal

Belo Horizonte

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Gisele Cristiane Vaz

Efeito da ativação de núcleos hipotalâmicos na absorção de glicose
e sódio em ratos submetidos à perfusão jejunal

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Lage Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes

Belo Horizonte

2008

Resumo

Estudos têm apontado os núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e dorsomedial (DMH) como relés importantes para a elaboração da resposta ao estresse. O principal objetivo deste estudo foi avaliar alterações metabólicas produzidas pela desinibição desses núcleos com o antagonista de receptor GABA_A, bicuculina metiodide (BMI). Ratos Wistar (n = 4 -10) (280 - 300g) foram anestesiados (tribromoetanol 250mg/Kg) e receberam implante da cânula guia central unilateral no PVN ou DMH. Após 2 dias, sob anestesia, os animais receberam implante de catéter na artéria femoral. Depois de 24h, os animais receberam microinjeções centrais de salina (0,9%) 100 nL ou BMI (10pmol/100nL). Foram registrados os parâmetros cardiovasculares por 15 minutos após a microinjeção. Posteriormente, os animais foram anestesiados (pentobarbitol sódico 40mg/Kg) e submetidos à laparotomia mediana para isolamento e canulação de 15 cm da alça jejunal. Após perfusão basal, procedeu-se a perfusão com solução de Tyrode 2 (pH=8), contendo glicose, sódio e potássio duas vezes mais concentrada que o usual, que foi infundida através da alça isolada por 40 minutos. Amostras do perfusato foram coletadas a cada 10 minutos e amostras do sangue foram coletadas nos tempos 0', 15' e 40' após início da perfusão. Ao final do experimento, amostras do fígado e o músculo gastrocnêmio foram coletados. Outro grupo de animais, enquanto tinha os parâmetros cardiovasculares registrados recebeu microinjeção de salina no DMH e foi posteriormente submetido ao estresse por jato de ar, após, passou pelos mesmos procedimentos experimentais. Os resultados desse grupo foram comparados com aqueles que receberam BMI no DMH. A microinjeção de BMI tanto no PVN ou DMH produziu aumento de PAM e FC. Animais que receberam BMI no PVN apresentaram elevada absorção jejunal de glicose nos tempos 20' (0,019 ± 0,003 vs. 0,042 ± 0,003 mM) (p<0,001), 30' (0,021 ± 0,002 vs. 0,035 ± 0,003 mM) (p<0,01) e 40' (0,023 ± 0,004 vs. 0,037 ± 0,003 mM) (p<0,01), aumento na absorção jejunal de sódio nos tempos de 30' (32,5 ± 6,4 vs. 105,6 ± 21,2 mM) (p<0,05) e 40' (34,5 ± 9,1 vs. 122,9 ± 31,3 mM) (p<0,05) e na concentração plasmática de lactato nos tempos 15' (2,0 ± 0,1 vs. 1,5 ± 0,1 mM) (p<0,05) e 40' (2,2 ± 0,2 vs. 1,5 ± 0,2 mM) (p<0,05). Foi observado nos mesmos animais, diminuição da insulina sérica aferida apenas no tempo de 15 minutos após o início de perfusão do Tyrode 2 (0,3 ± 0,04 vs. 0,5 ± 0,04 ng/mL) (p<0,01), diminuição da G-6-P (0,253 ± 0,020 vs. 0,380 ± 0,063 μmol/g) (p<0,05) e ATP (0,038 ± 0,013 vs. 0,166 ± 0,065 μmol/g) (p<0,05) musculares. Os animais que receberam microinjeção de BMI no DMH apresentaram diminuição da absorção de sódio nos tempos 10' (42,3 ± 4,7 vs. 19,6 ± 2,2 mM) (p<0,01) e 20' (39,5 ± 3,5 vs. 23,5 ± 4,6 mM) (p<0,05), diminuição da G-6-P (0,011 ± 0,002 vs. 0,002 ± 0,001 μmol/g) (p<0,05) no fígado e um aumento deste mesmo metabólito no músculo (0,427 ± 0,099 vs. 0,201 ± 0,051 μmol/g) (p<0,05). Animais submetidos ao estresse por jato de ar quando comparados aos que receberam BMI no DMH apresentaram alterações cardiovasculares similares, no entanto, as alterações metabólicas foram diferentes. Embora diferentes efeitos tenham sido encontrados na ativação desses núcleos, ambos apresentaram alterações relevantes que podem estar envolvidas na resposta ao estresse emocional.

Abstract

Studies have pointed to hypothalamus nucleus paraventricular (PVN) and dorsomedial (DMH) as important relays to elaborate the stress response. The aim of this study was to evaluate metabolic changes produced by these nucleus disinhibition with the antagonist receptor GABA_A bicuculline methiodide (BMI). Wistar rats (n = 4 - 10) (280 - 300g) were anesthetized (tribromoethanol 250mg/Kg) and received unilateral guide cannula implant into PVN or DMH. After 2 days, under anesthesia the animal received a cateter implantation in femoral artery. After 24 hours, the animal received vehicle (0.9%) 100 nL or BMI (10pmol/100nL) into PVN or DMH. Cardiovascular parameters were measured during 15 minutes after the microinjection. Afterwards, the animals were anesthetized (pentobarbitol sodium 40mg/Kg) e submitted a medium laparotomy to isolate 15 cm of the jejunal loop. After the basal perfusion, proceeded the perfusion with Tyrode 2 (pH=8) solution, twice concentrated to glucose, sodium and potassium for 40 minutes. Perfused samples were taken each 10 min. intervals during the 40 min. experiments. Blood samples were taken on times 0', 15' e 40' after the beginning of tyrode 2 perfusion. At the end of the experiment, liver and gastrocnemius muscle samples were collected. Another group of animals while had the cardiovascular parameters recorded received saline microinjection into the DMH and were submitted to air jet stress. The results of this group were compared with those one who received BMI into PVN or DMH. BMI into PVN and DMH produced increase in blood pressure and heart rate. The animals which received BMI into PVN showed increase in glucose jejunal absorption on times 20' (0.019 ± 0.003 vs. 0.042 ± 0.003 mM) ($p < 0.001$), 30' (0.021 ± 0.002 vs. 0.035 ± 0.003 mM) ($p < 0.01$) and 40' (0.023 ± 0.004 vs. 0.037 ± 0.003 mM) ($p < 0.01$), increase in sodium absorption on times 30' (32.5 ± 6.4 vs. 105.6 ± 21.2 mM) ($p < 0.05$) and 40' (34.5 ± 9.1 vs. 122.9 ± 31.3 mM) ($p < 0.05$) and in plasmatic lactate on times 15' (2.0 ± 0.1 vs. 1.5 ± 0.1 mM) ($p < 0.05$) and 40' (2.2 ± 0.2 vs. 1.5 ± 0.2 mM) ($p < 0,05$). In the same animal were observed decrease in serum insulin measured 15 minutes after the beginning of Tyrode 2 perfusion (0.3 ± 0.04 vs. 0.5 ± 0.04 ng/mL) ($p < 0.01$), decrease in muscle G-6-P (0.253 ± 0.020 vs. 0.380 ± 0.063 μ mol/g) ($p < 0.05$) and ATP (0.038 ± 0.013 vs. 0.166 ± 0.065 μ mol/g) ($p < 0.05$) levels. The animals wich received BMI into DMH presented decrease in sodium jejunal absorption on times 10' (42.3 ± 4.7 vs. 19.6 ± 2.2 mM) ($p < 0.01$) and 20' (39.5 ± 3.5 vs. 23.5 ± 4.6 mM) ($p < 0.05$). Decrease in liver G-6-P (0.011 ± 0.002 vs. 0.002 ± 0.001 μ mol/g) ($p < 0.05$) and increase of this same metabolite in muscle (0.427 ± 0.099 vs. 0.201 ± 0.051 μ mol/g) ($p < 0.05$). Animals submitted to air jet stress when compared with those who receive BMI into DMH presented cardiovascular alterations similar, but the metabolic changes were different. Although different effects have been found after stimulate of these nucleus, both presented important changes, which implicate them in the organization of the response to emocional stress.

Lista de figuras

Figura	Página
1 Principais núcleos do hipotálamo	4
2 Organização neuronal do eixo cérebro-intestino	11
3 Modelo clássico da absorção de monossacarídeos e sódio no enterócito	13
4 Substratos das vias glicolítica/gliconeogênica e glicogênica/glicogenólica	21
5 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B)	39
6 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre a absorção jejunal de glicose	41
7 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre a absorção jejunal de sódio	42
8 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre o conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B)	44
9 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre os níveis plasmáticos de glicose (A) e lactato (B) plasmáticos	45
10 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre os níveis plasmáticos de insulina	47
11 Efeito da microinjeção de BMI no PVN sobre o conteúdo de metabólitos da via glicolítica	48
12 Representação esquemática e fotomicrografia dos sítios de microinjeção dos animais que receberam salina ou BMI no PVN	50
13 Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B)	52
14 Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre a absorção de jejunal de glicose	54
15 Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre a absorção jejunal de sódio	55

16	Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B)	57
17	Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose	58
18	Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina	60
19	Efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre a conteúdo de metabólitos da via glicolítica	61
20	Representação esquemática e fotomicrografia dos sítios de microinjeção dos animais que receberam salina ou BMI no DMH	63
21	Efeito comparativo da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B)	65
22	Efeito comparativo da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre a absorção jejunal de glicose	66
23	Efeito da comparativo da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre a absorção jejunal de sódio	68
24	Efeito da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B)	69
25	Efeito comparativo da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose	71
26	Efeito comparativo da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina	72
27	Efeito da microinjeção de BMI no PVN ou DMH sobre o conteúdo de metabólitos da via glicolítica	74
28	Efeito do estresse por jato de ar comparado com o efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B)	76
29	Efeito do estresse por jato de ar comparado com o efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre a absorção jejunal de glicose	78
30	Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI no DMH sobre a absorção jejunal de sódio	80
31	Efeito do estresse por jato de ar comparado com o efeito da microinjeção de BMI no DMH sobre glicogênio hepático (A) e muscular (B)	82

32	Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI no DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose	84
33	Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI no DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina	85
34	Representação esquemática dos sítios de microinjeção dos animais que receberam salina no DMH e foram submetidos ao estresse por jato de ar	87

Lista de tabelas

Tabela	Página
1 Valores médios \pm erro padrão dos parâmetros cardiovasculares basais e após microinjeção de salina e BMI no PVN	38
2 Valores médios \pm erro padrão dos parâmetros cardiovasculares basais e após microinjeção de salina e BMI no PVN	51

Lista de abreviaturas

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

AMP - monofosfato adenosina

ATP - trifosfato adenosina

BMI - bicuculina metiodide

CRH - hormônio de liberação de corticotropina

DMH - hipotálamo dorsomedial

DVC - complexo vagal dorsal

FC - frequência cardíaca

GABA_A - ácido gama-aminobutírico

GIP - polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose

GLP1 - polipeptídeo 1 semelhante ao glucagon

GLUT2 - transportador 2 de glicose

GLUT4 - transportador 4 de glicose

GLUT5 - transportador 5 de glicose

HPA - hipotálamo-hipófise adrenal

IML - coluna intermediolateral

LHA - área hipotalâmica lateral

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NTS - núcleo do trato solitário

PAM - pressão arterial média

PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM - bulbo rostroventrolateral

SGLT1 - transportador de glicose dependente de sódio

SNC - sistema nervoso central

SNE - sistema nervoso entérico

TGI - trato gastrointestinal

UTP - uridina trifosfato

VMH - núcleo ventromedial do hipotálamo

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
I - INTRODUÇÃO	1
1 - Estresse e Núcleos Hipotalâmicos Envolvidos na Resposta ao Estresse Emocional	2
2 - Estresse e Absorção Intestinal de Glicose e Sódio	10
3 - Metabolismo da Glicose	18
II - OBJETIVOS	24
1 - Objetivo Geral	24
2 - Objetivos Específicos	24
III - MATERIAL E MÉTODOS	26
1 - Animais	26
2 - Grupos Experimentais	26
3 - Anestesia	27
4 - Procedimentos Cirúrgicos	27
5 - Registro da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	29
6 - Procedimento das Microinjeções	29
7 - Droga	30
8 - Perfusão Jejunal do Tyrode 1 e Tyrode 2	30
9 - Procedimentos Experimentais	31
10 - Histologia	33
11 - Dosagens	33
12 - Análise Estatística dos Resultados	37

IV - RESULTADOS	38
1 - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo	38
2 - Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo	51
3 - Comparação dos Resultados Encontrados entre os Núcleos Paraventricular e Dorsomedial do Hipotálamo	64
4 - Estresse por Jato de Ar	75
V - DISCUSSÃO	88
1 - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo	89
2 - Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo	93
3 - Núcleos Hipotalâmicos Paraventricular e Dorsomedial	96
4 - Núcleos Dorsomedial do Hipotálamo e Estresse por Jato de Ar	98
VI - CONCLUSÃO	99
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

Agradecimentos

O que posso dizer nesse momento, mais um capítulo se encerra e um novo começa a ser escrito. Na verdade, a única coisa da qual tenho mais certeza a cada dia é que tenho muita sorte, por ter em minha vida pessoas, sem as quais, talvez não conseguiria ter chegado até aqui. Pessoas, que presentes no meu cotidiano ou mesmo longe me ajudam, diretamente, me dispensando um pouco de seu tempo ou apenas seus pensamentos positivos para que eu consiga realizar minhas tarefas da melhor maneira possível. Dessa forma tenho muito a agradecer...

Primeiramente, a Deus, presença constante em minha vida, por ter me dado o que tenho de mais importante, o amor sincero da minha família e carinho dos meus amigos. Por sempre estar me guiando, nunca me deixar desanimar diante das dificuldades e por sempre atender todas as minhas orações ...

Aos meus pais Ademir e Edna, que são o meu maior tesouro, meu chão, o meu tudo... nunca conseguiria expressar em palavras o tamanho do meu amor e gratidão, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, sonhando e realizando os meus sonhos junto comigo...

Exemplos de amor incondicional, amizade e dedicação sempre dispensados a mim e aos meus irmãos.

Meus amados irmãos Josy e Alisson e meus cunhados Roney e Kelly pelo carinho, preocupação e apoio sempre...

Ao Cláudio, Ieda e Andréia por toda consideração...

Aos professores Elizabeth Lage Borges e Marco Antônio Peliky Fontes pela orientação e co-orientação respectivamente, pela oportunidade e confiança.

Aos professores Andrea Siqueira Haibara, Maria José Campagnole-Santos e Robson Souza Santos, pelo bom convívio e aprendizado no Laboratório de Hipertensão.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG: Cândido Celso Coimbra, Maria Aparecida Vieira e Jorge Luiz Pesquero. Aos professores Marcelo Santoro (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG), Geovanni Dantas Cassali (Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG) e Maria José Neves (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear - CDTN) pela disponibilidade e ajuda na realização desse trabalho.

Ao Almir, Zezé, Marilene, Janine, Patrícia e demais funcionários de outros laboratórios (Hipertensão, Endócrino, Renal, Departamento de Bioquímica e Imunologia) pelo apoio técnico, sem o qual não seria possível realizar esse trabalho.

Ao meu querido amigo Carlos Henrique pela ajuda imensurável e apoio nas horas mais difíceis.

Ao meu querido amigo Marcelo, pela colaboração direta e inestimável amizade.

Ao Gonzaga pela ajuda e ensinamentos.

Aos meus amigos: Nívia e Daniel, Vanice, Flavia, Priscila, Érica, Daniele lanzer, Augusto e Nayra. Obrigada pelas palavras de apoio, pelos ombros amigos e por tudo mais em todos os momentos...

Aos colegas do Laboratório de hipertensão, em especial Renata Vieira, Janaína e Sônia pela excelente convivência.

As minhas queridíssimas amigas Amanda e Larissa que estão comigo desde onde tudo começou... Ouro Preto.

A todos vocês, muito obrigada!!!

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas ...

Que já têm a forma do nosso corpo ...

E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares ...

É o tempo da travessia ...

E se não ousarmos fazê-la ...

Teremos ficado ... para sempre ...

À margem de nós mesmos ...

Fernando Pessoa

I - INTRODUÇÃO

A experiência de passar por uma situação de estresse é comum a todos os seres vivos. A percepção de uma situação estressora desencadeia respostas adaptativas através de alterações autonômicas e endócrinas (HERMAN; CULLINAN *et al.*, 1997).

O hipotálamo é uma região importante na integração da resposta ao estresse. Dentre os núcleos hipotalâmicos envolvidos nesta resposta destacam-se o paraventricular (PVN) e dorsomedial (DMH) (MARTIN; HAYWOOD *et al.*, 1993; DIMICCO *et al.*, 2002). O PVN é uma região de integração de informações do ambiente externo e interno que responde a um estressor secretando hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (HERMAN; CULLINAN *et al.*, 1997). Já o DMH parece estar diretamente envolvido na resposta cardiovascular ao estresse emocional, sua ativação provoca mudanças comportamentais e endócrinas semelhantes às aquelas evocadas pelo estresse emocional agudo (DIMICCO *et al.*, 1996).

Estudos têm demonstrado a participação desses núcleos em alterações gastrointestinais (MONNIKES *et al.*, 1992; GREENWOOD; DIMICCO, 1995) e metabólicas (KALSBECK *et al.*, 2004; ZAIA *et al.*, 1997) encontradas em situações de estresse.

1 - Estresse e Núcleos Hipotalâmicos Envolvidos na Resposta ao Estresse Emocional

Estresse

O estresse pode ser definido como um estado de ameaça à homeostase do indivíduo. Durante situações de estresse, respostas compensatórias são ativadas para sustentar a homeostase. Estas respostas resultam da ativação de circuitos centrais específicos que são genética e constitutivamente programados e constantemente modulados por fatores ambientais (PACÁK; PALKOVITZ, 2001).

A resposta fisiológica ao estresse emocional consiste em uma integração de mudanças autonômicas e endócrinas (DIMICCO *et al.*, 2002). Embora essas mudanças possam aumentar a probabilidade de sobrevivência do indivíduo frente a determinadas circunstâncias, quando exacerbadas elas também podem estar ligadas a vários estados patológicos em humanos, incluindo doenças cardiovasculares (FOLKOW, 1998) diabetes mellitus (SURWIT *et al.*, 1992; ZARDOOZ *et al.*, 2006) e desordens funcionais gastrointestinais (MAYER, 2000).

Estudos indicam que o hipotálamo é uma região importante na integração das respostas autonômicas/endócrinas (BERNARDIS; BELINGER, 1998) e comportamentais ao estresse emocional. Já em 1928 experimentos de BARD demonstraram que a ativação dos componentes responsáveis pelas respostas de luta e fuga dependia de um hipotálamo intacto.

Vários núcleos e sub-regiões hipotalâmicas têm sido apontados como mediadores da resposta fisiológica ao estresse, entre eles o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Figura 1) (CALLAHAN *et al.*, 1989; MARTIN; HAYWOOD, 1993). No entanto, na última década foi sugerido o envolvimento do núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH) (Figura 1) na mediação das respostas funcionais ao estresse (DIMICCO *et al.*, 2002).

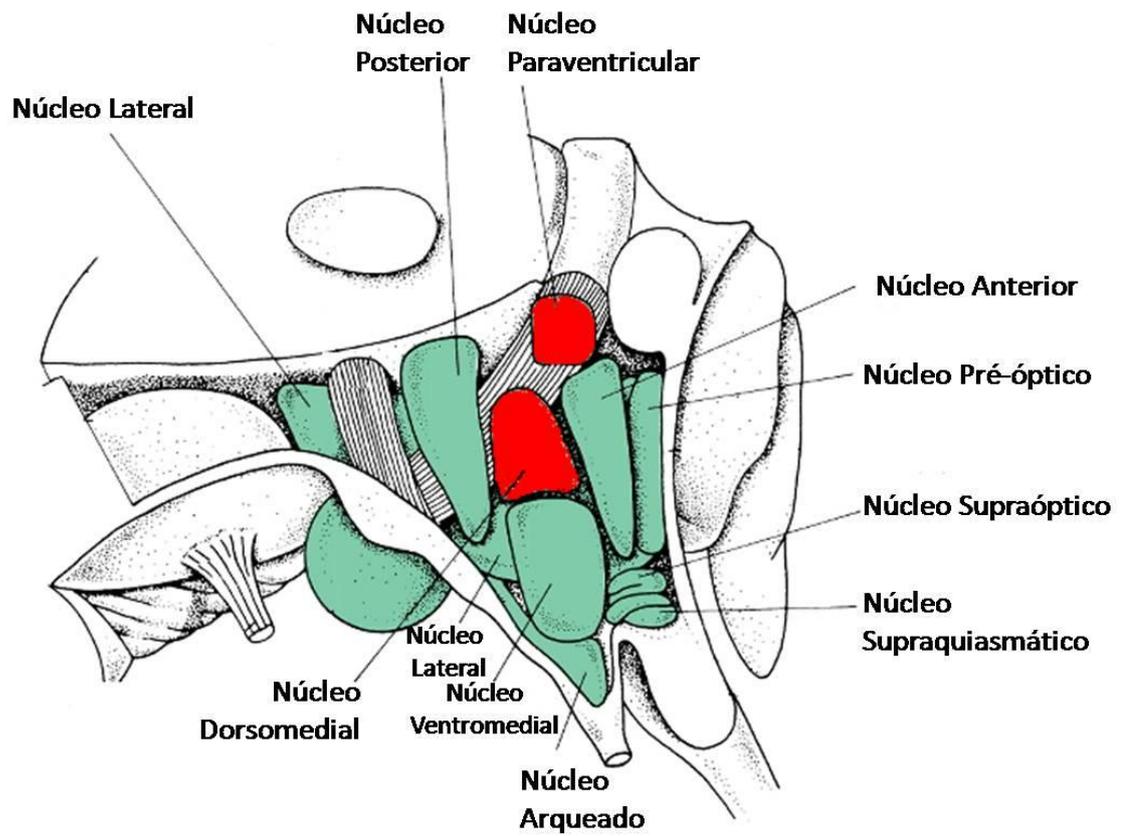


Figura 1: Principais núcleos do hipotálamo vistos de uma projeção a partir do terceiro ventrículo (adaptado de BERNE *et al.*, 2004).

Núcleo paraventricular do hipotálamo

O PVN está localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo (Figura 1). Ele é composto por grandes neurônios magnocelulares e neurônios menores, parvocelulares. Os neurônios magnocelulares localizam-se nas porções laterais do PVN e enviam projeções para a hipófise posterior. Eles são responsáveis pela secreção de vasopressina e ocitocina. Os neurônios parvocelulares localizam-se medialmente e enviam projeções para outros sítios do sistema nervoso central, incluindo regiões que são importantes para o controle autonômico (BLAIR *et al.*, 1996; BADOER, 2001).

Quanto às aferências, sabe-se que os neurônios do PVN recebem projeções de várias áreas bulbares como o núcleo do trato solitário (NTS) e bulbo rostroventrolateral (RVLM), áreas importantes para resposta cardiovascular (DAMPNEY, 2004) e de outras áreas hipotalâmicas como o DMH (DiMicco *et al.*, 2002). O PVN envia projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral (IML) e para o complexo dorso vagal (DVC) (ZHANG *et al.*, 1999; ZHANG; FOGEL, 2002).

O PVN é um núcleo primariamente envolvido no controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenocortical (HPA) (HERMAN *et al.*, 2002). Este sistema responde a ameaça real ou perceptiva secretando glicocorticóides, que servem para alertar o organismo às mudanças ambientais e fisiológicas visando manter a homeostase (HERMAN; CULLINAN, 1997). Os glicocorticóides agem em numerosos órgãos incluindo cérebro. (MUNCK *et al.*, 1984; MCEWEN; STELLAR, 1993). O PVN integra uma variedade de informações do ambiente interno e externo, mediando um sinal secretório para

o córtex da adrenal (HERMAN *et al.*, 2002). O controle da secreção de glicocorticóides é regulado, principalmente, por uma seleta população de neurônios do PVN. Quando estimulados por algum fator estressante, estes neurônios secretam o hormônio de liberação de corticotropina (CRH), um importante mediador da resposta central ao estresse (BHATIA; TANDON, 2005) na eminência média (porção inferior do hipotálamo), estimulando os secretagogos da hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que irá estimular a síntese e secreção dos glicocorticóides pelo córtex da adrenal (HERMAN *et al.*, 1997).

Estudos indicam que o PVN é núcleo de integração para respostas endócrinas e cardiovasculares (IONESCU *et al.*, 1989). Em 1989 KANNAN *et al.* demonstraram que a ativação do PVN levava a um aumento da atividade simpática. Em estudos de MARTIN *et al.*, 1991 foi observado que a microinjeção de BMI no PVN produziu aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e catecolaminas plasmáticas (epinefrina e norepinefrina). MARTIN; HAYWOOD, 1992 observaram que a estimulação do PVN com glutamato produziu os mesmos efeitos.

Núcleo dorsomedial do hipotálamo

O DMH integrava a clássica “área de defesa do hipotálamo”. A estimulação elétrica desta região provocava reação de defesa, caracterizada por mudanças autonômicas e comportamentais tipicamente vistas quando o organismo era confrontado com uma situação ameaçadora (DIMICCO *et al.*, 1996).

O DMH está localizado adjacente ao terceiro ventrículo, caudal ao núcleo paraventricular do hipotálamo, dorsal ao núcleo ventromedial e ventral à zona incerta. Suas bordas laterais e caudais são pouco distintas. Lateralmente, ele é circundado pela região perifornical da área hipotalâmica lateral, com os limites de seu pólo caudal terminando no núcleo periventricular posterior (FONTES *et al.*, 2006) (Figura 1). Ele é subdividido em duas porções distintas: uma difusa e uma compacta (PAXINOS; WATSON, 1986), sendo esta última claramente delimitada no pólo posterior do DMH. Estudos indicam que a porção compacta do DMH seria a estrutura mais responsiva do mesmo à microinjeção de aminoácidos excitatórios (DE NOVELLIS *et al.*, 1995) ou de antagonistas do receptor do ácido gama aminobutírico A (GABA_A) (FONTES *et al.*, 2006).

O DMH recebe projeções do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), do núcleo lateral do hipotálamo (LHA) e do PVN, sendo o VMH a maior fonte de projeções para o DMH (TER HORST; LUITEN, 1986). Estudos anatômicos indicam que o DMH tem pouca ou nenhuma projeção direta para a medula espinhal, o que leva a crer que a via simpatoexcitatória do DMH deve incluir uma ou mais conexões sinápticas com outros núcleos supra espinhais (CAO; MORRISON, 2004; DA SILVA *et al.* 2003, 2006; FONTES *et al.*, 2006; HORIUCHI *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado que a desinibição dos neurônios do DMH por bicuculina metiodide (BMI), antagonista do receptor GABA_A, resulta em aumento da pressão arterial, frequência cardíaca (DE NOVELLIS *et al.*, 1995; DIMICCO *et al.*, 1996) e da atividade simpática (DIMICCO *et al.*, 1996), além de produzir alterações neuroendócrinas (BAILEY; DIMICCO, 2001),

gastrointestinais (GREENWOOD; DIMICCO, 1995) e mudanças comportamentais similares às aquelas evocadas pelo estresse emocional agudo (DIMICCO *et al.*, 1996).

Estudos em ratos acordados, mostraram que a desinibição do DMH produz aumento da temperatura corporal, de frequência cardíaca e pressão arterial que são acompanhados de aumento na atividade locomotora e nos níveis plasmáticos do ACTH – este último considerado um importante sinalizador das respostas neuroendócrinas ao estresse (MENEZES *et al.*, 2006; BAILEY; DIMICCO *et al.*, 2002).

DIMICCO *et al.*, 2002 aponta para a possibilidade de neurônios do DMH terem um papel importante na ativação dos neurônios do PVN, que são responsáveis pelo recrutamento do eixo HPA em algumas formas de estresse. Em estudo de STOTZ-POTTER *et al.*, 1996b o estresse provocado pelo jato de ar levou a um aumento dos níveis de ACTH plasmáticos que foi significativamente reduzido pela microinjeção de muscimol, agonista do receptor GABA_A, no PVN. A microinjeção de muscimol no DMH também inibiu o aumento plasmático do ACTH. MORIN *et al.*, 2001 observaram que animais que receberam microinjeção de salina no DMH e foram, posteriormente, submetidos ao estresse por jato de ar apresentaram expressão de Fos (marcador de ativação neuronal) no PVN. No entanto, quando recebiam microinjeção de muscimol no mesmo local a expressão de Fos no PVN apresentava-se diminuída. Desse modo, a atividade neuronal do PVN e DMH parece ter um papel importante na ativação do eixo HPA (DIMICCO *et al.*, 2002).

Em conjunto, esses achados indicam que o PVN e DMH podem ser regiões críticas na integração das respostas funcionais em presença de um estímulo emocional agudo.

Núcleo dorsomedial do hipotálamo e estresse por jato de ar

Estudos têm demonstrado que o DMH é um importante componente das vias centrais que estão envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse por jato de ar. Animais que receberam microinjeção de muscimol no DMH e foram, posteriormente, submetidos ao estresse por jato de ar apresentaram atenuação da resposta pressora e taquicárdica em 68 e 85% respectivamente. A mesma microinjeção na área intermediária entre o DMH e PVN atenuou a resposta pressora e taquicárdica em 52 e 46% respectivamente. Em contraste, microinjeções similares nas proximidades do PVN não alterou a resposta cardiovascular ao estresse (STOTZ-POTTER *et al.*, 1996a). Estes resultados implicam a ativação neural do DMH na geração das mudanças cardiovasculares observadas no estresse por jato de ar (STOTZ-POTTER *et al.*, 1996a).

2 - Estresse e Absorção Intestinal de Glicose e Sódio

O trato gastrointestinal tem como principal função a digestão e absorção de nutrientes ingeridos através da dieta. Ele é regulado por peptídeos gastrointestinais secretados pelo próprio intestino ou por vias neurais: sistema nervoso central (SNC) e sua influência sobre o sistema nervoso entérico (SNE). O SNE é formado por grupamentos de neurônios do trato gastrointestinal que podem funcionar independentemente do SNC, embora este coordene diversas funções do SNE (GERSHON *et al.*, 1994). Ambos se conectam por vias simpáticas e parassimpáticas (GOYAL; HIRANO, 1996). O SNE controla a motilidade e secreção intestinal além de estar envolvido na regulação imune, no processo inflamatório e na microcirculação do trato gastrointestinal (COSTA; BROOKS, 1994) (Figura 2).

Cérebro e o intestino são órgãos altamente integrados, que se comunicam bidirecionalmente via SNC e SNE, sofrendo ainda influência do eixo HPA (JONES *et al.*, 2006).

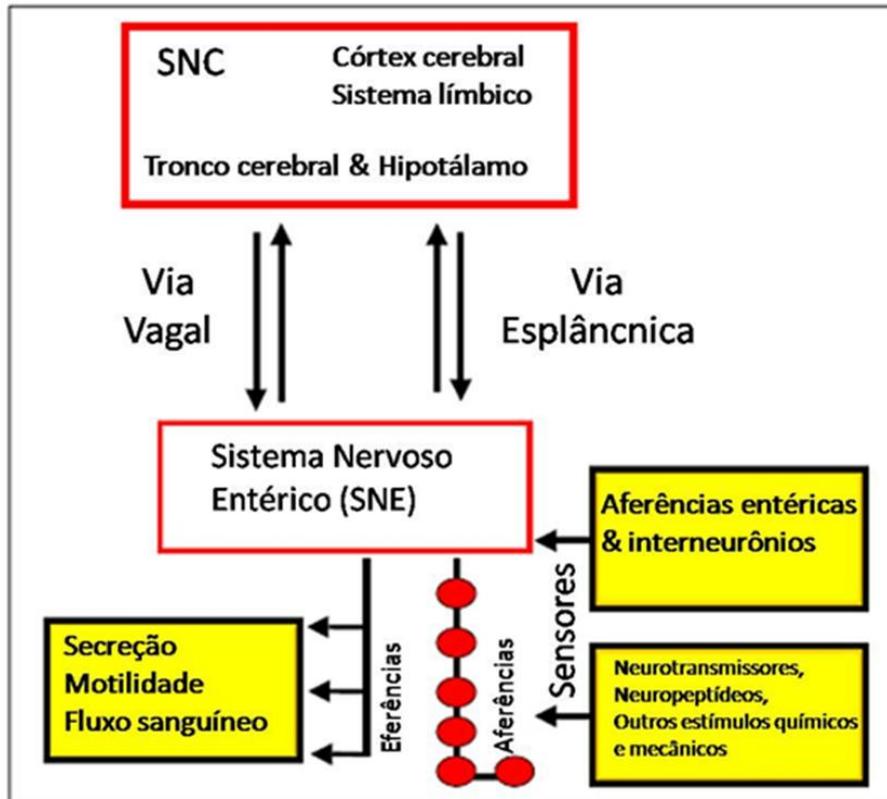


Figura 2: Organização neuronal do eixo cérebro-intestino, mostrando vias de comunicação do SNC e SNE (adaptado de KONTUREK *et al.*, 2004)

Os carboidratos são um importante componente da dieta, eles são absorvidos no trato gastrointestinal na forma dos monossacarídeos galactose, frutose e glicose (DROZDOWSKI; THONSON, 2006). Após a digestão, a glicose é captada do lúmen intestinal para o enterócito por transporte ativo secundário dependente de Na^+ , a energia para esse transporte provém do gradiente eletroquímico do Na^+ entre a luz e o meio intracelular, mantido pela bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase presente na membrana basolateral do enterócito. Esse processo irá ocorrer através do co-transportador Na^+ -glicose (SGLT1) presente na membrana apical da célula. A glicose deixa o enterócito, entrando na corrente sanguínea por difusão facilitada através do transportador de glicose 2 (GLUT2) (BOUDRY *et al.*, 2007; ZAHEDI; ALIPOUR, 2007) (Figura 3). No entanto, outra via de captação da glicose luminal pode ser utilizada. Sob determinadas situações como alterações enteroendócrinas, energéticas, diabetes experimental, longo período em dieta rica em carboidrato e realimentação após jejum ocorre a inserção de GLUT2 na membrana apical. Dessa forma, a absorção de glicose no enterócito será otimizada, já que além de entrar por transporte ativo secundário via SGLT1, ela também entrará por difusão facilitada via GLUT2, promovendo o aumento na absorção intestinal desse monossacarídeo (Figura 3) (MORGAN *et al.*, 2007).

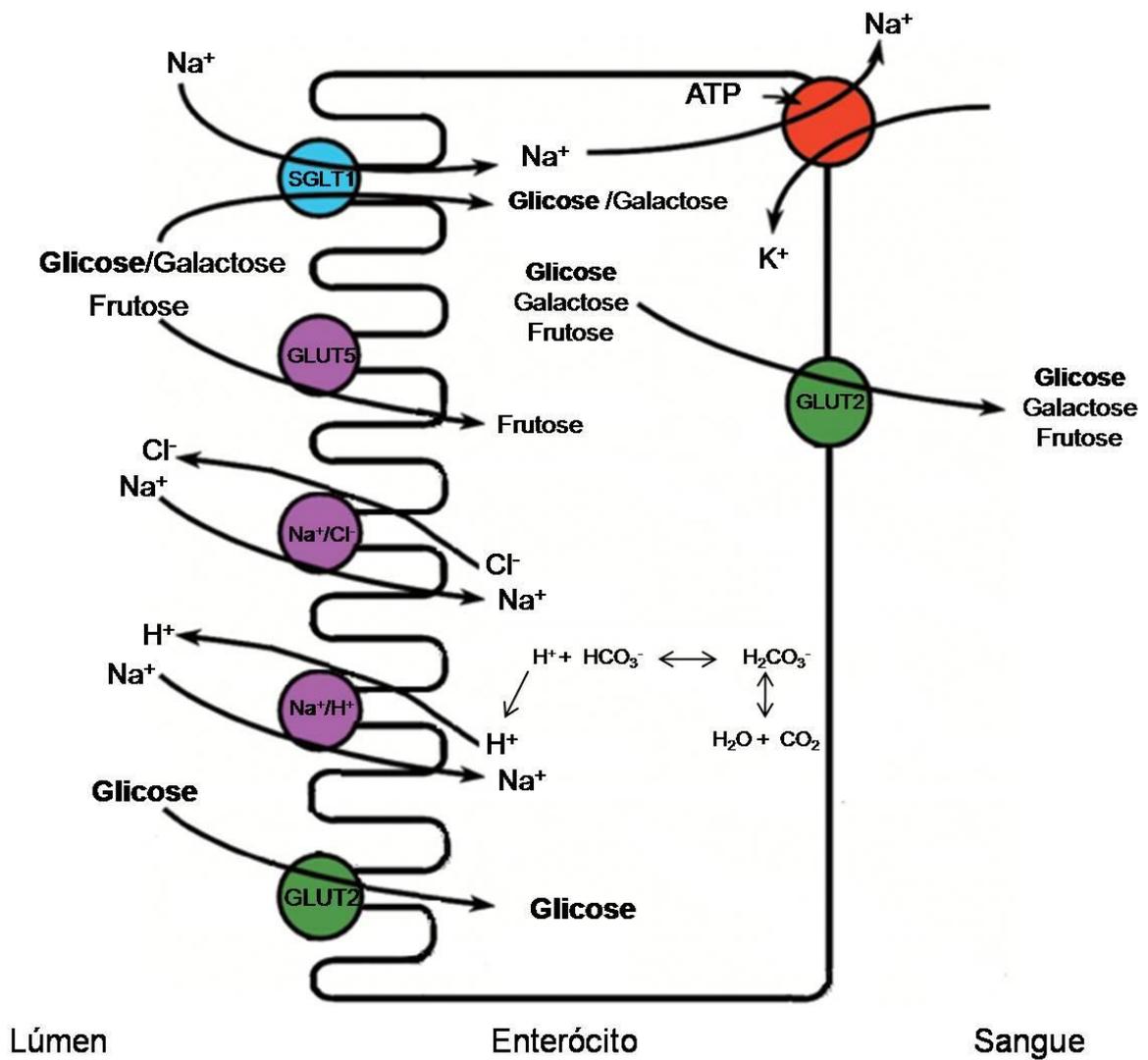


Figura 3: Modelo da absorção de monossacarídeos e sódio no enterócito (adaptado de DROZDOWSKI; THONSON, 2006)

A glicose desencadeia respostas endócrinas e neuronais desde seu aparecimento na cavidade oral até seu aumento na circulação. Na boca, ela estimula reflexos nervosos, em parte iniciados pela ativação de receptores gustativos e suas fibras aferentes, ativação desses reflexos é responsável pela secreção da fase cefálica da insulina. No intestino, a glicose estimula o SNE e a secreção do hormônio polipeptídeo insulino-trópico dependente de glicose (GIP), que aumenta a liberação da insulina dependente da glicose. A presença da glicose no intestino também estimula a liberação do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), que além de aumentar a liberação de insulina dependente de glicose, inibe a secreção de glucagon, regula o esvaziamento gástrico e inibe a ingestão de alimento (MARTY *et al.*, 2007). A manutenção do equilíbrio glicêmico é executada através de vários fatores, incluindo a taxa de absorção do carboidrato da dieta no intestino e a taxa de utilização da glicose pelos tecidos periféricos (NORDLIE *et al.*, 1999).

No duodeno e jejuno, o Na^+ poderá ser absorvido de várias maneiras: através de co-transporte juntamente com a glicose, galactose ou aminoácidos, via SGLT1; através do co-transportador $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$, onde a energia dissipada no influxo de sódio é utilizada para transportar o Cl^- ; O Na^+ poderá ser absorvido ainda via um co-transportador de troca Na^+/H^+ , que opera em paralelo com o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, desta forma a partir de CO_2 e H_2O presentes no interior da célula, na presença da anidrase carbônica forma-se HCO_3^- e H^+ , sendo o H^+ trocado com Na^+ e o HCO_3^- com Cl^- , possibilitando a entrada de Na^+ e Cl^- na célula. O Na^+ deixa a célula indo para corrente sanguínea através da bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ ATPase presente na membrana basolateral do enterócito (Figura 3). (FRIZZELL, *et al.*, 1979, LIEDTKE, *et al.*, 1982, , HATCH; FREEL, 2008).

Estudos indicam que a estimulação do PVN modula a atividade de neurônios do DVC que estão diretamente relacionados com a regulação do funcionamento do trato gastrointestinal (ZHANG; FOGEL, 2000). Dessa forma, o PVN poderia afetar as funções do TGI não somente pela liberação de hormônios hipofisários, mas também pela sua conexão com o DVC, que envia projeções eferentes diretas para o TGI.

Diversos trabalhos têm associado o efeito do estresse ao funcionamento do trato gastrointestinal. Eventos estressantes têm sido relacionados com a exacerbação sintomática de algumas das mais comuns doenças intestinais, incluindo desordens funcionais gastrointestinais, doença inflamatória do intestino, refluxo gastro-esofágico e úlcera péptica (MAYER, 2000; BHATIA; TANDON, 2005).

SHEPHERD *et al.*, 2004 observaram que animais submetidos ao estresse crônico (causado pela construção e modernização de prédios próximos ao biotério) apresentaram diminuição da absorção intestinal de glicose e do transportador GLUT2 na membrana apical do enterócito. Animais controle tratados com dexametasona apresentaram as mesmas alterações. Já BOUDRY *et al.*, 2007, observaram aumento do transportador GLUT2 na membrana apical de animais submetidos a um modelo de estresse emocional crônico (*water-avoidance stress*). HELLIWELL *et al.*, 2003 demonstraram que a inserção do GLUT2 na membrana apical ocorre em minutos.

BARCLAY; TUNBERG, 1987 observaram que indivíduos submetidos a um modelo de estresse psicológico apresentaram diminuição na absorção de sódio, cloro e água durante o estresse. No ano seguinte, os mesmos autores verificaram alterações similares em indivíduos submetidos a um modelo físico

de estresse (*cold-induced pain stress*), sendo nesse estudo as alterações absorptivas acompanhadas de aumento nos níveis plasmáticos de norepinefrina.

SAUNDERS *et al.*, 1994 demonstraram que animais submetidos ao estresse por contenção ou estresse por contenção associado ao frio apresentaram aumento da permeabilidade intestinal para macromoléculas e secreção intestinal do íon cloreto estimulada. KILIAAN *et al.*, 1998 observaram que o efeito de aumento da permeabilidade intestinal era revertido na presença de atropina, o que sugeria um mecanismo envolvendo a liberação de acetilcolina. Em 2000, MEDDINGS; SWAIN, verificaram que o aumento da permeabilidade intestinal de animais que sofreram estresse de contenção era mediado por glicocorticóides, uma vez que, animais adrenalectomizados ou que recebiam bloqueio farmacológico de glicocorticóides não apresentaram diferença em relação ao seu controle.

Estudos também relacionam alterações da motilidade intestinal à presença de estressores. Humanos submetidos a estresse psicológico ou físico apresentaram aumento da motilidade colônica (SATISH *et al.*, 1998). MONNIKIES *et al.*, 1993 observaram que animais que receberam infusão de CRH no PVN apresentaram retardo do esvaziamento gástrico e aumento da motilidade do cólon; vagotomia e injeção de atropina diminuíram o efeito gástrico e aboliram o efeito colônico, já a microinjeção de antagonista de CRH aboliu alterações gástricas e colônicas. Estudos também envolvem o DMH em alterações de motilidade intestinal. GREENWOOD; DIMICCO, 1995 demonstraram que animais que tiveram o DMH desinibido por BMI apresentaram aumento de motilidade jejunal e colônica, sendo que o aumento da motilidade jejunal foi abolido quando o animal era submetido à vagotomia

bilateral ou injeção de atropina, já a motilidade do cólon foi drasticamente reduzida por ambos

3 - Metabolismo da Glicose

A glicose é um nutriente essencial para o corpo humano. Ela é a fonte de energia mais importante para muitas células, principalmente do sistema nervoso central e hemácias que dependem de um suplemento regular de glicose no sangue (NORDLIE *et al.*, 1999). A manutenção do equilíbrio glicêmico é executada através de fatores neurais e endócrinos.

A glicose entra nas células através de transporte passivo de acordo com o seu gradiente de concentração mediado por proteínas transportadoras especializadas (GLUT2 fígado e GLUT4 músculo) (ROACH, 2002). Após sua entrada na célula ela pode ser utilizada para a produção de energia, entrando na via glicolítica.

Glicólise é a seqüência metabólica onde ocorre a conversão da glicose em lactato ou piruvato, provendo energia para o organismo (PILKIS *et al.*, 1988). A glicólise é iniciada com a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato, reação catalisada pela enzima glicocinase (células hepáticas) ou hexocinase (demais células). O próximo passo é a isomerização da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, reação catalisada pela fosfoglicose isomerase. Na próxima reação, a frutose-6-fosfato é fosforilada a frutose-1-6-bisfosfato, reação catalisada pela fosfofrutocinase. Em um segundo estágio, a frutose-1-6-bisfosfato é clivada em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, reação catalizada pela aldolase. Já em um terceiro estágio, cada molécula de gliceraldeído passa por uma série de reações até formar piruvato. A via glicolítica é regulada pelas enzimas hexocinase, fosfofrutocinase e piruvatocinase (conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato). A fosfofrutocinase

é a principal enzima de controle da via glicolítica, ela é inibida por altos níveis de adenosina trifosfato (ATP), pela diminuição do pH e pelo citrato. A adenosina monofosfato (AMP) e a frutose-2-6-bisfosfato (formada a partir da frutose-6-fosfato) são potentes ativadores da fosfofrutoquinase (DEPRÉT *et al.*, 1998) (Figura 4). Subseqüentemente, em condições aeróbicas o piruvato entrará no ciclo do ácido cítrico originando NADH e FADH₂, estes na fosforilação oxidativa formarão ATP.

Após uma refeição, a elevação da glicose sanguínea provoca alterações autonômicas e hormonais que favorecem a captação de glicose pelos tecidos e sua conversão em glicogênio (ROACH, 2002). Na síntese de glicogênio a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato, reação catalisada pela fosfoglicomutase. A síntese de glicogênio requer uma forma ativada da glicose, a uridina difosfato glicose (UDP-glicose), que é sintetizada a partir da uridina trifosfato (UTP) e glicose-1-fosfato. A UDP-glicose é adicionada à molécula de glicogênio, esta reação é catalisada pela enzima glicogênio sintase, uma importante enzima reguladora da síntese de glicogênio (FERRER *et al.*, 2003) (Figura 4).

Quando a glicemia tende a cair, alterações centrais e endócrinas levam o fígado a liberar glicose para a corrente sanguínea, seja através da glicogenólise ou gliconeogênese (ROACH, 2002).

Na glicogenólise ocorrerá: (1) liberação da glicose-1-fosfato a partir do glicogênio, reação catalisada pela enzima glicogênio fosforilase, importante reguladora da glicogenólise (2) remodelação do glicogênio para que ele não continue sendo substrato para degradação e (3) conversão da glicose-1-fosfato

em glicose-6-fosfato, que poderá ser substrato para a glicólise ou ser convertida em glicose e liberada para a corrente sanguínea (ROACH, 2002).

A gliconeogênese é a via onde lactato, glicerol e alguns aminoácidos serão convertidos em glicose ou glicogênio, ocorre principalmente no fígado. A principal importância dessa via é manter um nível glicêmico adequado durante jejum ou quando estoques de glicogênio estão depletados (PILKIS *et al.*, 1988).

Glicólise e gliconeogênese são vias reciprocamente reguladas (NORDLIE *et al.*, 1999).

Durante exposição a um estressor respostas adaptativas são desencadeadas mobilizando e redirecionando energia. A garantia de suprimento energético para órgãos cruciais como SNC se dá, preferencialmente, pela liberação de catecolaminas e glicocorticóides (hormônios ligados a situações de resposta ao estresse) que, geralmente aumentam a gliconeogênese e glicogenólise e inibem a captação periférica da glicose (PACÁK; PALKOVITZ, 2001).

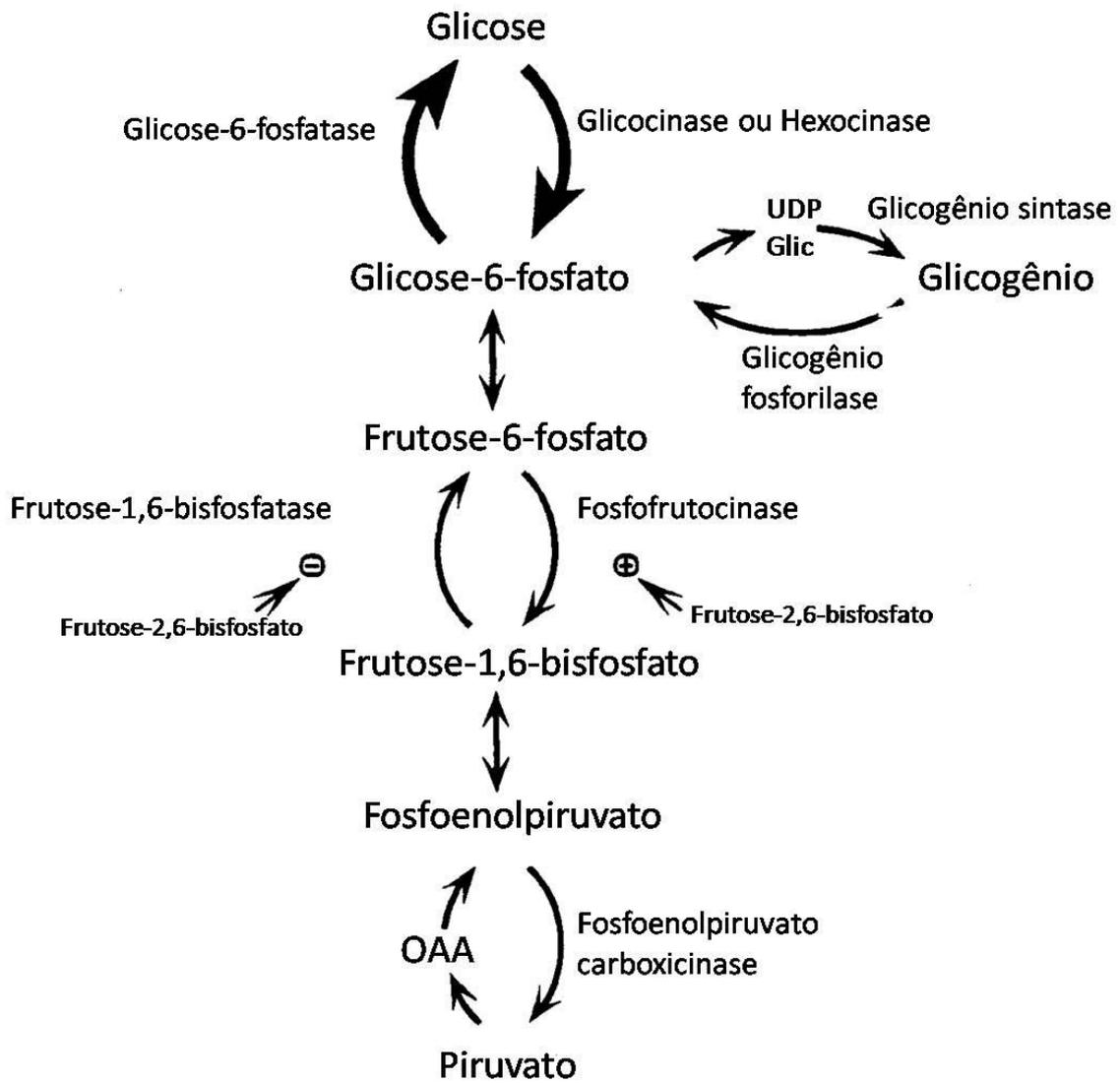


Figura 4: substratos das vias glicolítica/gliconeogênica e glicogênica/glicogenólica. OAA, oxalacetato. (Adaptado de NORDLIE *et al.*, 1999)

Em 1989, IONESCUS *et al.*, demonstraram que a microinjeção de norepinefrina no PVN levou a um aumento da glicemia e diminuição nos níveis plasmáticos de insulina, sendo as alterações glicêmicas mediadas por receptores alfa e beta adrenérgicos. KALSBECK *et al.*, 2004 demonstraram que animais submetidos a infusão crônica (2 horas) de BMI no PVN apresentaram hiperglicemia durante este período. Em estudo de ZARDOOZ *et al.*, 2006, foi observado que animais submetidos ao estresse por contenção durante uma hora, duas vezes ao dia, por 30 dias apresentaram aumento de glicemia e corticosterona, diminuição da insulina plasmática e perda de peso corporal.

Estudos também demonstram o envolvimento do DMH em alterações metabólicas. ZAIA *et al.*, 1997 observaram que a estimulação do DMH por norepinefrina ou epinefrina levou a um aumento de glicemia e diminuição de lipídeos plasmáticos. Provavelmente, estes efeitos eram mediados por receptores beta-adrenérgicos, uma vez que a injeção de propanolol reverteu esses resultados. BAILEY; DIMICCO *et al.*, 2001 demonstraram que a ativação do DMH por BMI ou kainato provocou um aumento da atividade locomotora e do ACTH plasmático.

Estudos utilizando método de perfusão intestinal revelaram o efeito do peptídeo intestinal vasoativo (VIP), microinjetado no NTS, sobre a absorção jejunal de glicose, sódio e potássio (BORGES *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2004). Estes autores demonstraram, pelo mesmo método, o efeito da influência da icterícia obstrutiva sobre a absorção intestinal de glicose e eletrólitos (BORGES *et al.*, 1998).

Apesar dos diversos estudos apontando o PVN e o DMH na participação das respostas funcionais ao estresse, poucos mostram a relação específica

desses núcleos e do estresse por jato de ar com a absorção intestinal de glicose e sódio e metabolismo da glicose.

II - OBJETIVOS

1 - Objetivo Geral

Investigar os efeitos da desinibição química por bicuculina metiodide (BMI), antagonista dos receptores GABA_A, nos núcleos hipotalâmicos paraventricular e dorsomedial sobre o metabolismo de glicose e absorção intestinal de glicose e sódio. Comparar os efeitos provocados pela microinjeção de BMI no DMH com aqueles provocados pelo estresse por jato de ar sobre os mesmos parâmetros.

2 - Objetivos Específicos

- Investigar a absorção jejunal de glicose e sódio em animais submetidos à desinibição prévia do PVN e DMH por BMI;
- Quantificar o conteúdo de glicogênio muscular e hepático dos animais submetidos à desinibição prévia do PVN e DMH por BMI;
- Quantificar os metabólitos intermediários da via glicolítica/gliconeogênica, glicogênica/glicogenólica: glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e ATP no fígado e músculo gastrocnêmio dos animais submetidos à desinibição do PVN e DMH por BMI;
- Quantificar os níveis plasmáticos de glicose, lactato e insulina dos animais submetidos à estimulação do PVN por BMI;
- Quantificar níveis plasmáticos de glicose dos animais submetidos a estimulação do DMH por BMI;

- Comparar a absorção intestinal de glicose e sódio, glicose plasmática e conteúdo de glicogênio hepático e muscular dos animais que receberam BMI no DMH com aqueles submetidos ao estresse por jato de ar.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar (280 a 300g) provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luz artificial (12 a 14 horas por dia), em temperatura controlada ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica, recebendo ração e água sem restrições.

Os experimentos realizados seguiram os princípios adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), tendo sido o projeto aprovado pelo mesmo (protocolo número 021/05).

2 - Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos:

- Grupo I - Microinjeção de salina no PVN (n = 7)
- Grupo II - Microinjeção de BMI no PVN (n = 10)
- Grupo III - Microinjeção de salina no DMH (n = 9)
- Grupo IV - Microinjeção de BMI no DMH (n = 7)
- Grupo V - Microinjeção de salina no DMH de animais submetidos ao estresse por jato de ar (n = 5)

3 - Anestesia

Para os procedimentos cirúrgicos foram utilizados dois tipos de anestésicos. O Tribromoetanol (250 mg/Kg i.p. suplementado quando necessário), para o implante da cânula-guia e da cânula na artéria femoral e o pentobarbital sódico (40 mg/Kg, i.p. suplementado quando necessário) para o implante das cânulas intestinais. Para sacrifício dos animais foi utilizada *overdose* de pentobarbital sódico (120 mg/Kg, i.p. suplementado quando necessário).

4 - Procedimentos Cirúrgicos

Implante da cânula-guia

A cânula-guia foi fixada em um suporte preso a torre do aparelho estereotáxico (Stoelting, IL, USA). Sob anestesia, os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico com a barra incisiva fixada 3,3 mm abaixo da linha aural.

Após uma injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado à epinefrina 1:2000000, para provocar uma vasoconstrição local, foi feita uma incisão mediana para a exposição do crânio e localização do bregma. Dois parafusos foram fixados no crânio para ancoragem da cânula-guia. Em seguida, a cânula-guia confeccionada a partir de agulhas 22 G cortadas em tamanho de 16 mm foi implantada no núcleo de acordo com as coordenadas do atlas PAXINOS; WATSON, 1986, PVN: 1,8 mm posterior, 0,5 mm lateral e 7,2

mm ventral, para DMH: 3,2 mm posterior, 0,6 mm lateral e 7,8 mm ventral e fixada com acrílico dental polimerizável. Um oclusor metálico, no tamanho de 16 mm, foi introduzido na cânula-guia para evitar sua obstrução.

Com a finalidade fixar a cânula-guia e evitar que o movimento do animal pudesse danificá-la, um anel de plástico de um cm de diâmetro por um cm de altura com uma fenda longitudinal de cinco mm foi fixado com acrílico dental autopolimerizável ao redor da mesma.

Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose intramuscular de 0,2 mL de pentabiótico veterinário (1:200000 UI).

Canulação da artéria femoral

Sob anestesia, uma pequena incisão na região inguinal foi efetuada para a exposição da artéria femoral. Um cateter de polietileno (PE-10 Clay Adams, 0.011 ID) de aproximadamente quatro centímetros (soldado por aquecimento a um tubo de PE-50 de 15 cm) foi introduzido na artéria femoral, até alcançar a aorta abdominal. A perviedade desse cateter foi mantida com solução salina (0,9%), contendo heparina 25 UI/mL. Após a introdução do cateter na artéria, este foi passado pelo tecido subcutâneo do animal até a sua exteriorização na região interescapular. Todas as incisões foram fechadas com pequenas suturas.

No momento do registro a extremidade do catéter foi conectada ao sistema de aquisição de dados para obtenção dos sinais de pressão arterial e frequência cardíaca. Durante a perfusão intestinal a retirada de amostras de sangue foi realizada através do mesmo cateter.

Implante da cânula intestinal

Sob jejum de 12 horas e anestesia, foi feita uma incisão na linha mediana da cavidade abdominal do animal. Um segmento do jejuno, quinze cm após a flexura duodenal-jejunal, foi isolado, mantendo-se o suprimento sanguíneo e nervoso. Duas cânulas, de dois centímetros cada, foram introduzidas e amarradas às extremidades da alça jejunal isolada. A parede abdominal foi fechada para a manutenção da temperatura corpórea e para evitar a desidratação do tecido. As cânulas foram exteriorizadas através das extremidades da sutura abdominal.

5 - Registro da Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca

A cânula inserida na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão, ligado a um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems model MP100 A-CE, CA, USA). Freqüência cardíaca e pressão arterial foram monitoradas por aproximadamente 15 minutos após a microinjeção.

6 - Procedimento das microinjeções

Para a microinjeção da salina ou da BMI foram confeccionadas cânulas-injetoras a partir de agulhas gengivais 30 G. As agulhas foram cortadas no tamanho de 17 mm e conectadas a um tubo de polietileno (Norton, 0.010) e a uma seringa Hamilton de 10 μ L preenchida com água deionizada. O polietileno foi preenchido com a salina ou BMI, e entre a água destilada e a substância

contida no polietileno formou-se uma pequena bolha. A cânula-injetora foi introduzida na cânula-guia e a salina ou BMI injetada. Durante a administração das substâncias, o movimento descendente da bolha de ar indicou o sucesso da microinjeção. Após a retirada da cânula-injetora ela foi testada, para verificar alguma obstrução.

7 - Droga

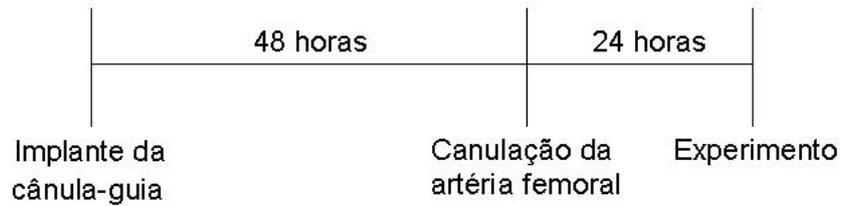
A droga utilizada na microinjeção foi a Bicuculina Metiodide (antagonista do receptor GABA_A) na concentração de 10 pmol/100 nL, diluída em salina estéril. O volume microinjetado nos animais experimentais foi de 100 nL. Nos animais controle foi injetada salina estéril na concentração de 0,9%, no mesmo volume de 100 nL.

8 - Perfusão Jejunal do Tyrode 1 e Tyrode 2

Solução de Tyrode 1 (NaCl: 137 mM, KCl: 2,7 mM, CaCl₂: 1,36 mM, MgCl₂: 0,49 mM, NaHCO₂: 11,9 mM, D-glicose: 5mM), a 37°C, pH 8, foi perfundida na velocidade de 0,5 mL/min por 15 minutos para equilibrar o lúmen jejunal (Borges et al, 2003). Posteriormente, procedeu-se a uma perfusão utilizando solução de Tyrode 2 a 37°C, pH 8, por 40 minutos. Esta solução era duas vezes mais concentrada para glicose, sódio e potássio quando comparada ao Tyrode 1.

9 - Procedimentos Experimentais

Os animais eram submetidos à estereotaxia (72 horas) e implante de cânula-guia (24 horas) antes do experimento.



Com o propósito de se verificar a influência da desinibição do PVN e do DMH pela BMI foi realizado o seguinte protocolo.

Experimento:



Com o objetivo de comparar os efeitos da estimulação química do DMH com o modelo de estresse por jato de ar, os animais foram colocados em um contensor, sendo exposto ao jato de ar (10 L/min) durante 10 minutos.

Seguiu-se dessa forma o protocolo abaixo. Lembrando que estes animais também passaram por estereotaxia e canulação da artéria femoral, como descrito previamente.

Experimento:



Após o início do registro, acompanhou-se a estabilização dos parâmetros cardiovasculares do animal, por um período de 15 minutos ou mais, se necessário.

Amostras do perfusato (Tyrode 2) foram coletadas separadamente, em tubos mantidos em gelo a cada dez minutos e os volumes mensurados.

Amostras de sangue (0,2 mL) foram coletadas, através da cânula inserida na artéria femoral, após a perfusão do Tyrode 1 (tempo 0), e nos tempos de 15 e 40 minutos após o início da perfusão do Tyrode 2.

Ao final do experimento, foram coletados um grama de fígado e um grama do músculo gastrocnêmio para dosagens bioquímicas. Posteriormente, o animal foi sacrificado por overdose de anestésico.

10 - Histologia

Após o sacrifício do animal, foi realizada microinjeção do corante alcian blue 2% (100 nL) no sítio da microinjeção de BMI para subsequente confirmação histológica. Os cérebros foram removidos e fixados em formaldeído a 4% (diluído em água deionizada) por no mínimo 24 horas. Após este período, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 20% (diluído em água deionizada) permanecendo por no mínimo três dias. Cortes com a espessura de 100 μm foram obtidos de diferentes níveis no sentido coronal, na região do hipotálamo, em um micrótomo de congelamento. Os cortes foram colocados em lâminas de histologia previamente gelatinizadas, corados com vermelho neutro (1%) e posteriormente examinados por microscopia óptica.

11 - Dosagens

Glicose do perfusato

Após a coleta do líquido de perfusão, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante cinco minutos, quando necessário. A determinação da concentração de glicose do perfusato foi feita por método enzimático (Glicose God-Ana). A glicose absorvida foi calculada pela diferença entre as concentrações da mesma no influxo e efluente.

Sódio do perfusato

As concentrações dos íons sódio do perfusato foram medidas por fotometria de chama. As amostras foram diluídas em água deionizada (1:200) e lidas no fotômetro de chama (Fotômetro Celm 180). O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão, diluída em água deionizada (1:200) contendo sódio na concentração de 140 mM. O monitoramento foi feito por uma célula fotoelétrica onde cada elemento emite uma cor característica. As quantidades absorvidas de sódio foram calculadas pela diferença das concentrações desses íons no influxo e efluente.

Preparação do homogenato

A um grama de fígado ou do músculo gastrocnêmico foram adicionados três mL de solução de ácido perclórico a 6%. Os tecidos juntamente com o ácido foram homogeneizados e centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos. O volume do sobrenadante foi mensurado e neutralizado com solução de KOH a 10%.

Glicogênio muscular e hepático

O conteúdo de glicogênio dos tecidos foi medido de acordo com a técnica de HASSID *et al.*, 1957. O volume da amostra, proveniente do homogenato utilizado na dosagem variou de 35 a 80 μ L. Este volume foi completado com água destilada para o volume final de 1 mL. Em seguida,

adicionava-se 2 mL de solução de antrona em ácido sulfúrico a 0,2%. Após incubação por 10 minutos em banho de água fervente, foi realizada a leitura por espectrofotometria a 620 nm. As concentrações de glicose, estimadas por uma curva padrão, foram corrigidas pela diluição do volume adicionado de KOH, para neutralizar o pH. Os resultados foram expressos em miligrama de glicogênio por grama de tecido.

Metabólitos da via glicolítica/gliconeogênica, glicogênica/glicogenólica

Os metabólitos intermediários da via glicolítica foram dosados no material proveniente do homogenato de fígado e músculo por métodos espectrofotométricos baseados na redução ou oxidação dos nucleotídeos pirimidínicos NADP (H) ou NAD (H) por uma desidrogenase específica. A forma reduzida das coenzimas tem o seu pico máximo de absorção a 340 nm com um coeficiente de extinção molar de $6,22 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

Glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e ATP foram medidos numa mesma cubeta contendo 500 μL de uma mistura de tampões (Tris-HCl 100mM, pH = 8, EDTA 2 mM, KCl 100 mM, acetato de magnésio 10 mM) adicionado de 50 μL glicose 2mM, 50 μL de NADP 5mM e 200 μL da amostra. O volume final na cubeta era acertado para 1 mL adicionando água milique.

Ao conteúdo da cubeta adicionava-se sucessivamente glicose-6-fosfato desidrogenase (10 μL), que oxida a glicose-6-fosfato em 6-fosfoglicono- δ -lactona reduzindo o NADP^+ em NADPH. Em seguida, adicionava-se fosfoglicose isomerase (10 μL) para formar glicose-6-fosfato a partir da frutose-6-fosfato. Para a dosagem do ATP, adicionava-se a enzima hexocinase (10

μL), que a partir da glicose do meio formava glicose-6-fosfato, utilizando para isso ATP.

O método para a dosagem da glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato foi descrito por HOHORST, 1973 e o de ATP por LAMPRECH *et al.*, 1963.

Glicose e lactato plasmáticos

O sangue coletado, durante a perfusão, foi centrifugado a 13000 rpm por cinco minutos e apenas o plasma foi utilizado. A determinação das concentrações plasmáticas de glicose e lactato foram feitas por método enzimático autoanalyzer 2300 STARPLUS (Yellow String Inst.).

Os níveis plasmáticos de glicose dos animais que receberam BMI no DMH e daqueles que foram submetidos ao estresse por jato de ar foram dosados pelo método enzimático (Glicose God-Ana).

Insulina

Os níveis plasmáticos de insulina foram dosados pela técnica de radioimunoensaio (Linco Research, St. Charles, MO, EUA).

12 - Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram expressos por média (\pm) erro padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (one-way ANOVA) e teste t de Student. Estabeleceu-se o nível de significância em 5% ($p < 0,05$).

IV - RESULTADOS

1 - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

Efeito da estimulação do PVN sobre os parâmetros cardiovasculares

A microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN produziu aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) sobre os valores basais (Tabela 1). Houve aumento da PAM ($\Delta 1 \pm 1$ vs. 5 ± 1 mmHg) ($p < 0,05$) e da FC ($\Delta 0 \pm 1$ vs. 17 ± 3 bpm) ($p < 0,001$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) na mesma região (Figura 5).

Parâmetro	Microinjeção	Valor Basal	Resposta Máxima
PAM (mmHg)	Salina	95 ± 4	96 ± 4
	Bicuculina	103 ± 5	$109 \pm 5^*$
FC (bpm)	Salina	372 ± 15	373 ± 15
	Bicuculina	356 ± 8	$373 \pm 8^*$

Tabela 1: Valores médios \pm erro padrão dos parâmetros cardiovasculares basais e após microinjeção de salina e BMI no PVN (n salina = 7; n BMI = 10), (PAM e FC: $*p < 0,001$)

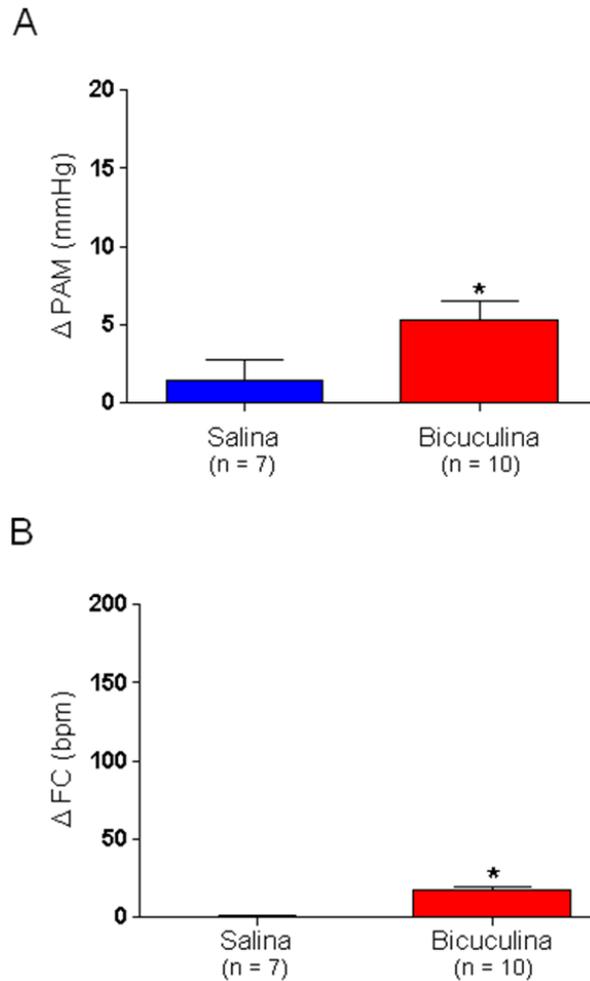


Figura 5: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B). Houve aumento da PAM e a FC quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina na mesma região (PAM: * $p < 0,05$; FC: * $p < 0,001$).

Efeito da estimulação do PVN sobre a absorção jejunal de glicose

A Figura 6 ilustra o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre a absorção jejunal de glicose, expressa pela diferença de concentração da glicose presente no influxo e efluente. Foi observada uma elevação na absorção da glicose nos tempos: 20' ($0,019 \pm 0,003$ vs. $0,042 \pm 0,003$ mM) ($p < 0,001$); 30' ($0,021 \pm 0,002$ vs. $0,035 \pm 0,003$ mM) ($p < 0,01$) e 40' ($0,023 \pm 0,004$ vs. $0,037 \pm 0,003$ mM) ($p < 0,01$); quando comparados os animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) na mesma região. Não houve diferença entre os grupos salina e BMI no tempo 10' ($0,027 \pm 0,003$ vs. $0,031 \pm 0,003$ mM).

Efeito da estimulação do PVN sobre a absorção jejunal de sódio

Observa-se na Figura 7, o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre a absorção jejunal de sódio, expressa pela diferença de concentração do sódio presente no influxo e efluente. Foi verificada elevação na absorção do sódio nos tempos: 30' ($32,5 \pm 6,4$ vs. $105,6 \pm 21,2$ mM) ($p < 0,05$) e 40' ($34,5 \pm 9,1$ vs. $122,9 \pm 31,3$ mM) ($p < 0,05$) quando comparados os animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) no mesmo local. Não houve diferença entre os grupos salina e BMI nos tempos 10' ($33,9 \pm 5,8$ vs. $66,5 \pm 30,2$ mM) e 20' ($35,4 \pm 9,9$ vs. $50,2 \pm 10,4$ mM).

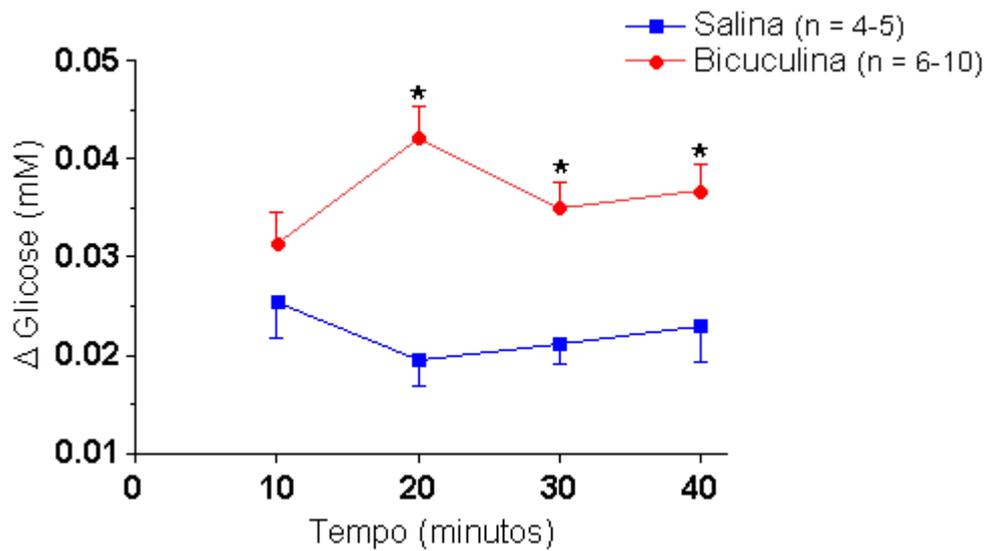


Figura 6: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre a absorção jejunal de glicose. Houve elevação na absorção da glicose a partir do tempo 20' quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (Tempo 20': * $p < 0,001$; Tempo 30' e 40': * $p < 0,01$).

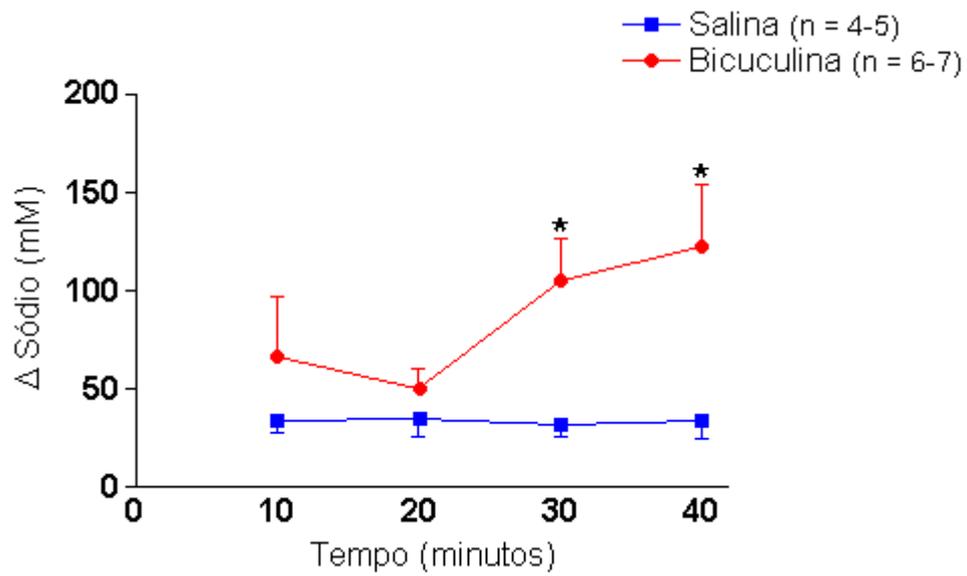


Figura 7: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre a absorção jejunal de sódio. Houve elevação na absorção do sódio nos tempos de 30' e 40' quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (Tempo 30' e 40': * $p < 0,05$).

Efeito da estimulação do PVN sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular

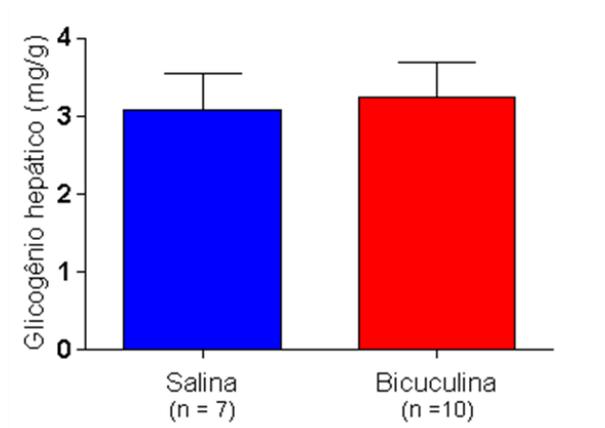
A Figura 8 mostra o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Não houve diferença entre o grupo que recebeu BMI quando comparado ao que recebeu salina (0,9%/100 nL) tanto em relação ao glicogênio hepático ($3,1 \pm 0,5$ vs. $3,2 \pm 0,4$ mg/g), quanto ao glicogênio muscular ($2,1 \pm 0,3$ vs. $1,7 \pm 0,2$ mg/g).

Efeito da estimulação do PVN sobre os níveis plasmáticos de glicose e lactato

Na Figura 9, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre os níveis plasmáticos de glicose e lactato. A glicose plasmática dos animais que receberam BMI no PVN não diferiu em nenhum dos pontos aferidos dos animais que receberam salina (0,9%/100 nL) no mesmo local: 0' ($6,9 \pm 0,5$ vs. $6,8 \pm 0,3$ mM); 15' ($5,9 \pm 0,3$ vs. $6,2 \pm 0,2$ mM) e 40' ($6,2 \pm 0,7$ vs. $7,1 \pm 0,4$ mM).

Foi observado, elevação do lactato plasmático nos tempos 15' ($1,5 \pm 0,1$ vs. $2,0 \pm 0,1$ mM) ($p < 0,05$) e 40' ($1,5 \pm 0,2$ vs. $2,2 \pm 0,2$ mM) ($p < 0,05$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina no mesmo local. Não ocorreu diferença entre os grupos salina e BMI no tempo 0' ($1,7 \pm 0,3$ vs. $2,0 \pm 0,2$ mM).

A



B

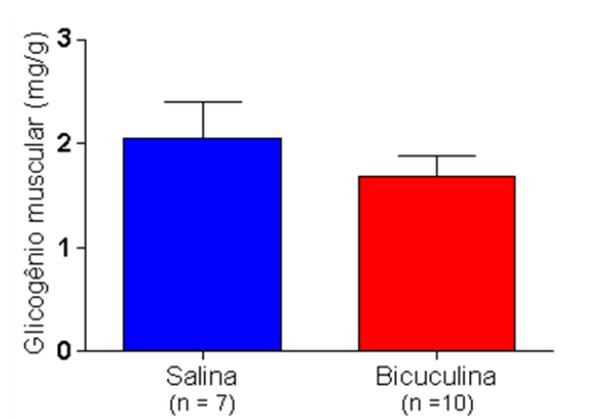


Figura 8: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre o conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B). Não houve diferença no conteúdo de glicogênio hepático ou muscular quando comparado grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local.

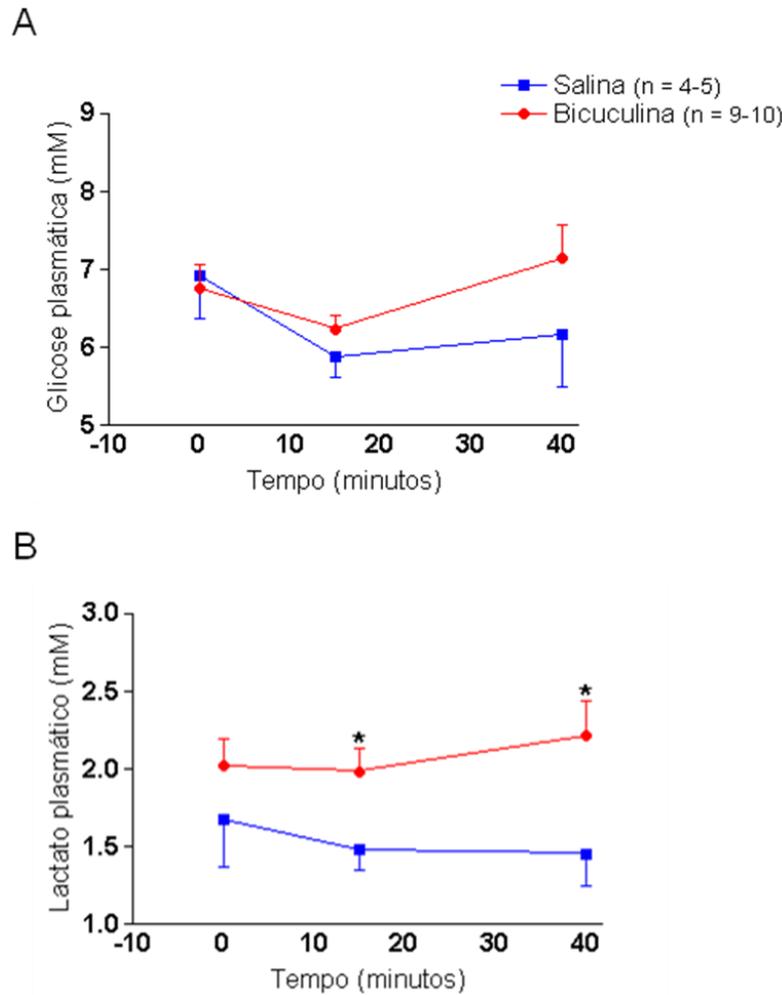


Figura 9: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre os níveis plasmáticos de glicose (A) e lactato (B). Não ocorreram alterações nos níveis séricos de glicose. No entanto, ocorreu aumento do lactato plasmático nos tempos 15' e 40' quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (* $p < 0,05$).

Efeito da estimulação do PVN sobre os níveis plasmáticos de insulina

A Figura 10 mostra o efeito da BMI (10pmol/100nL) no PVN sobre os níveis plasmáticos de insulina. Esta, foi aferida apenas no tempo de 15 minutos após o início de perfusão do Tyrode 2. Foi observada diminuição dos níveis séricos de insulina ($0,5 \pm 0,04$ vs. $0,3 \pm 0,04$ ng/mL) ($p < 0,01$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9% /100 nL) no mesmo local.

Efeito da estimulação do PVN sobre metabólitos hepáticos e musculares

Na Figura 11, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre o conteúdo hepático e muscular dos metabólitos via glicolítica G-6-P, F-6-P e ATP. No fígado não houve diferença no conteúdo de G-6-P ($0,037 \pm 0,008$ vs. $0,033 \pm 0,008$ $\mu\text{mol/g}$), F-6-P ($0,008 \pm 0,002$ vs. $0,016 \pm 0,004$ $\mu\text{mol/g}$) e ATP ($0,005 \pm 0,002$ vs. $0,003 \pm 0,001$ $\mu\text{mol/g}$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina no mesmo local.

No músculo houve diminuição da G-6-P ($0,380 \pm 0,063$ vs. $0,253 \pm 0,020$ $\mu\text{mol/g}$) ($p < 0,05$) e ATP ($0,166 \pm 0,065$ vs. $0,038 \pm 0,013$ $\mu\text{mol/g}$) ($p < 0,05$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina na mesma área. Não houve diferença da F-6-P muscular ($0,076 \pm 0,014$ vs. $0,066 \pm 0,008$ $\mu\text{mol/g}$) entre os grupos salina e BMI.

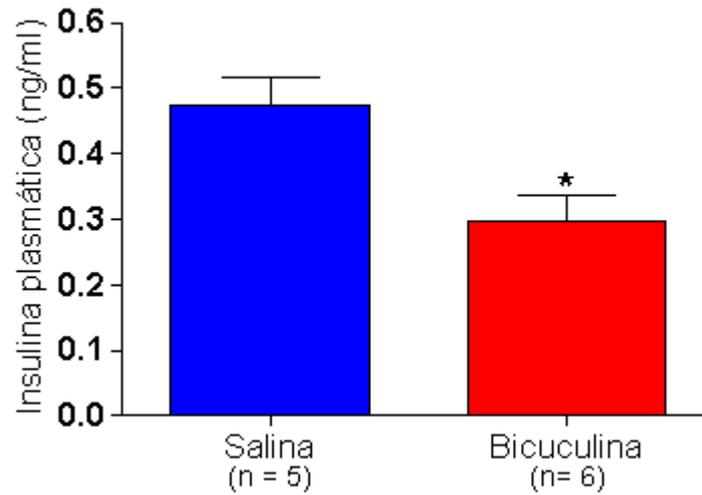


Figura 10: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre os níveis plasmáticos de insulina. Houve diminuição dos níveis séricos de insulina quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (* $p < 0,01$).

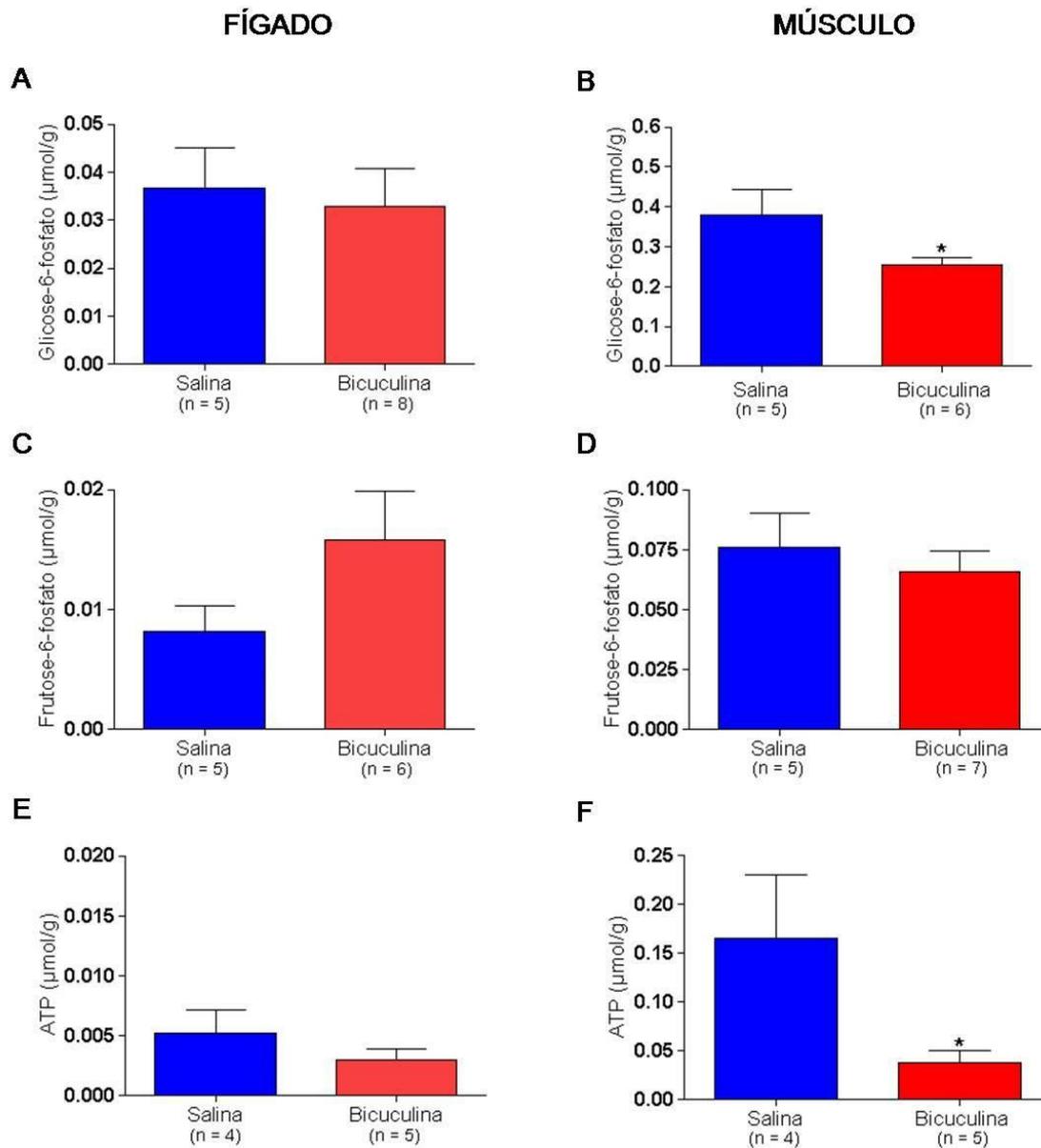


Figura 11: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN sobre os metabólitos da via glicolítica glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e ATP no fígado (A, C, E) e músculo (B, D e F). Não ocorreram alterações no conteúdo hepático dos metabólitos. No entanto, houve diminuição da G-6-P e ATP musculares quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina na mesma região (* $p < 0,05$).

Locais das microinjeções de BMI e salina no PVN

A figura 12 mostra os locais das microinjeções nos animais que receberam BMI ou salina no PVN.

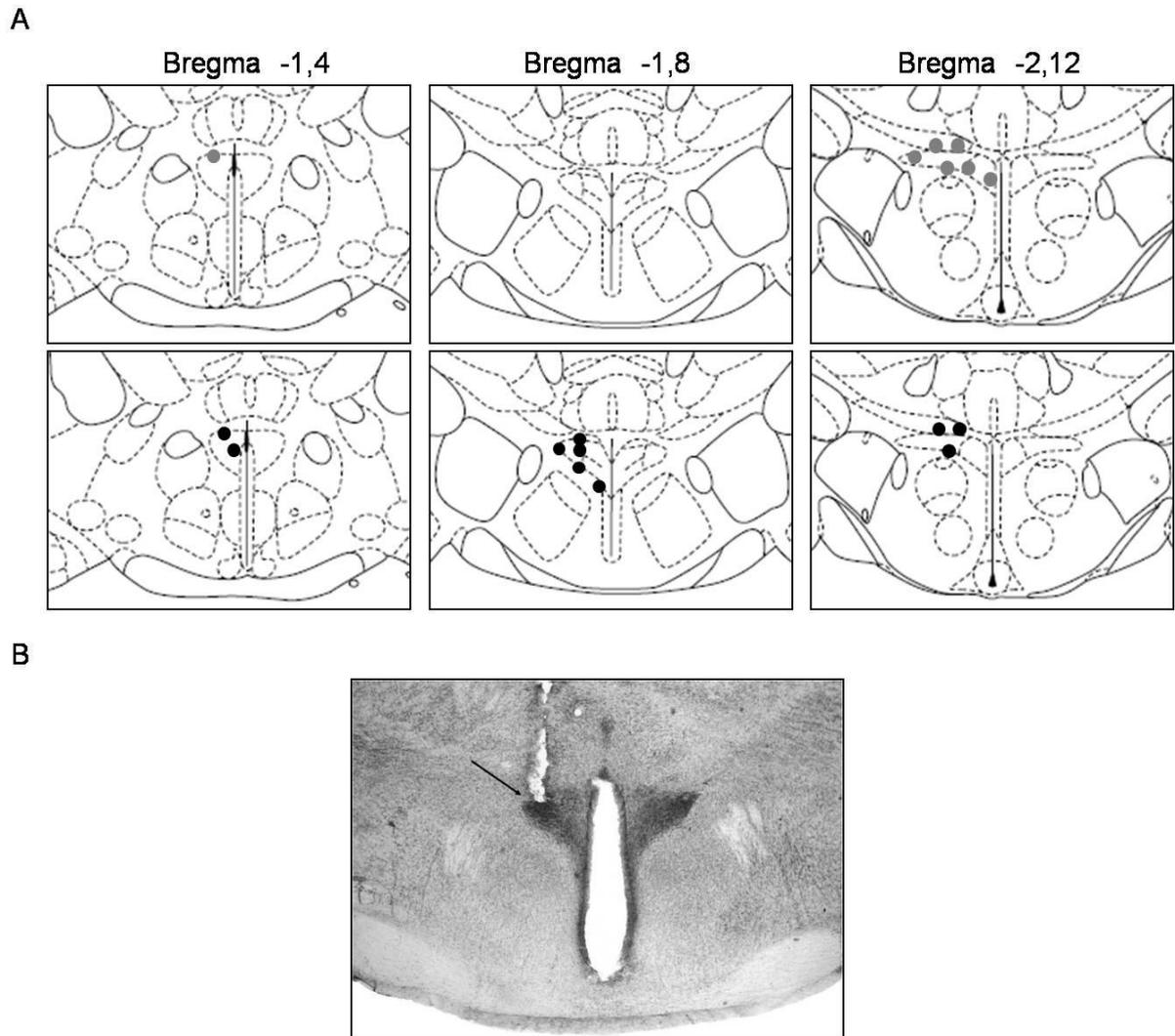


Figura 12: (A) Representação esquemática dos cortes coronais do PVN mostrando os locais da microinjeção de salina (círculo cinza, $n = 7$) e BMI (círculo preto, $n = 10$). (B) Fotomicrografia de um corte transversal do cérebro do rato mostrando um sítio de microinjeção unilateral no PVN. Seta indica o local da microinjeção.

2 - Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

Efeito da estimulação do DMH sobre os parâmetros cardiovasculares

A microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH produziu aumento da PAM e da FC sobre os valores basais (Tabela 2). Houve aumento pronunciado da PAM ($\Delta 0 \pm 1$ vs. 13 ± 4 mmHg) ($p < 0,01$) e FC ($\Delta 1 \pm 1$ vs. 141 ± 21 bpm) ($p < 0,001$) quando comparados os animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) na mesma região (Figura 13).

Parâmetro	Microinjeção	Valor Basal	Resposta Máxima
PAM (mmHg)	Salina	100 ± 4	99 ± 3
	Bicuculina	95 ± 3	$106 \pm 5^*$
FC (bpm)	Salina	352 ± 10	353 ± 10
	Bicuculina	329 ± 15	$470 \pm 19^*$

Tabela 2: Valores médios \pm erro padrão dos parâmetros cardiovasculares basais e após microinjeção de salina e BMI no DMH (n salina = 9; n BMI = 7), (PAM: * $p < 0,05$; FC: * $p < 0,001$)

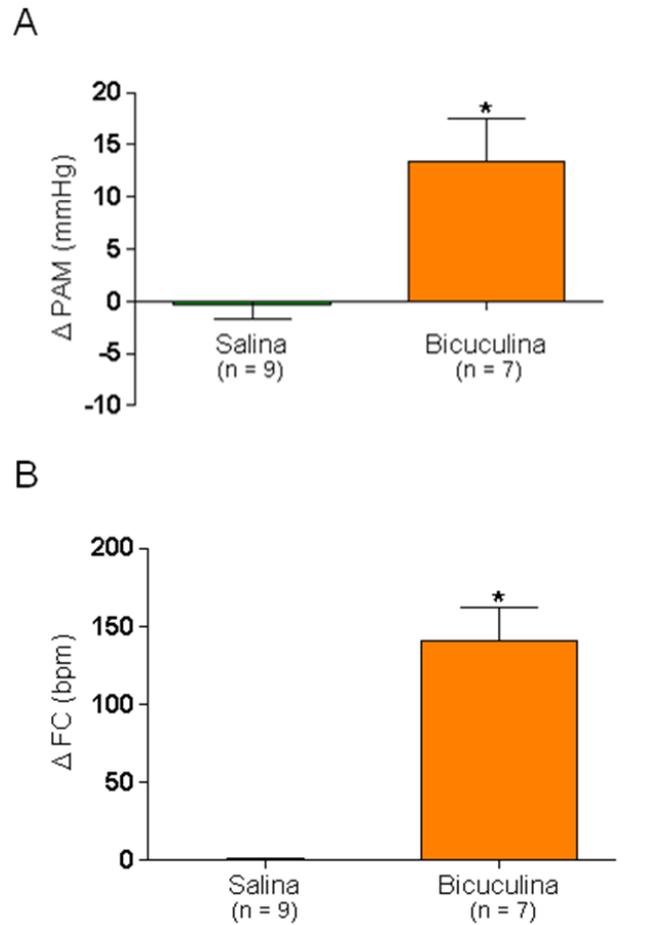


Figura 13: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B). Houve aumento da PAM e da FC quando comparado grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina na mesma região (PAM: * $p < 0,01$; FC: * $p < 0,001$).

Efeito da estimulação do DMH sobre a absorção jejunal de glicose

A Figura 14 mostra o efeito da microinjeção de BMI (10pmol/100nL) no DMH sobre a absorção jejunal de glicose, expressa pela diferença de concentração da glicose presente no influxo e efluente. Não houve diferença na absorção de glicose, quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) no mesmo local: 10' (0,024 ± 0,002 vs. 0,028 ± 0,003 mM); 20' (0,021 ± 0,003 vs. 0,029 ± 0,005 mM); 30' (0,019 ± 0,004 vs. 0,024 ± 0,007 mM) e 40' (0,017 ± 0,002 vs. 0,019 ± 0,004 mM).

Efeito da estimulação do DMH sobre a absorção jejunal de sódio

Pode ser observado na Figura 15 o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre a absorção jejunal de sódio, expressa pela diferença de concentração do sódio presente no influxo e efluente. Foi verificada absorção diminuída de sódio nos tempos 10' (42,3 ± 4,7 vs. 19,6 ± 2,2 mM) ($p < 0,01$) e 20' (39,5 ± 3,5 vs. 23,5 ± 4,6 mM) ($p < 0,05$) quando comparados animais que receberam de BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) no mesmo local. Não houve diferença nos tempos 30' (31,7 ± 3,7 vs. 32,9 ± 4,5 mM) e 40' (25,6 ± 3,6 vs. 18,3 ± 6,3 mM) entre os grupos salina e BMI.

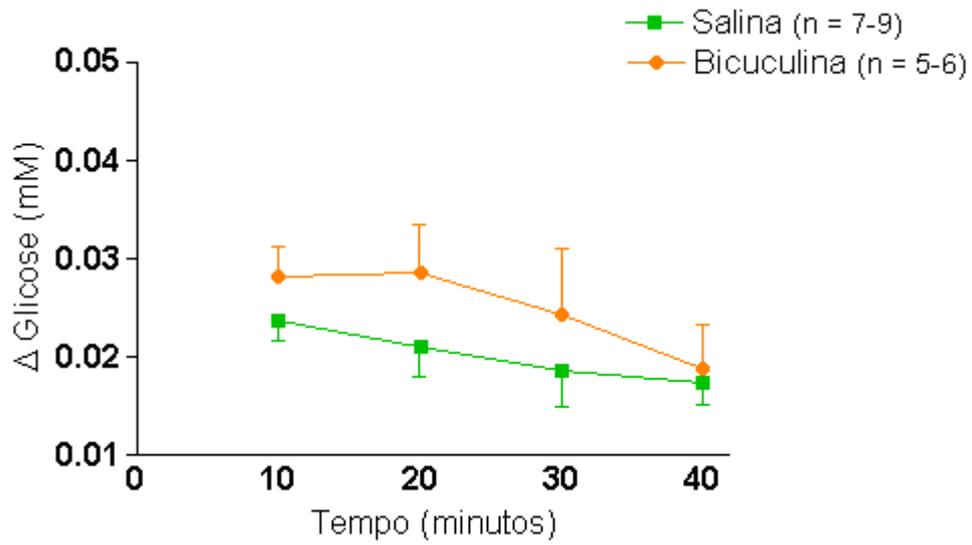


Figura 14: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre a absorção jejunal de glicose. Não houve diferença quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local.

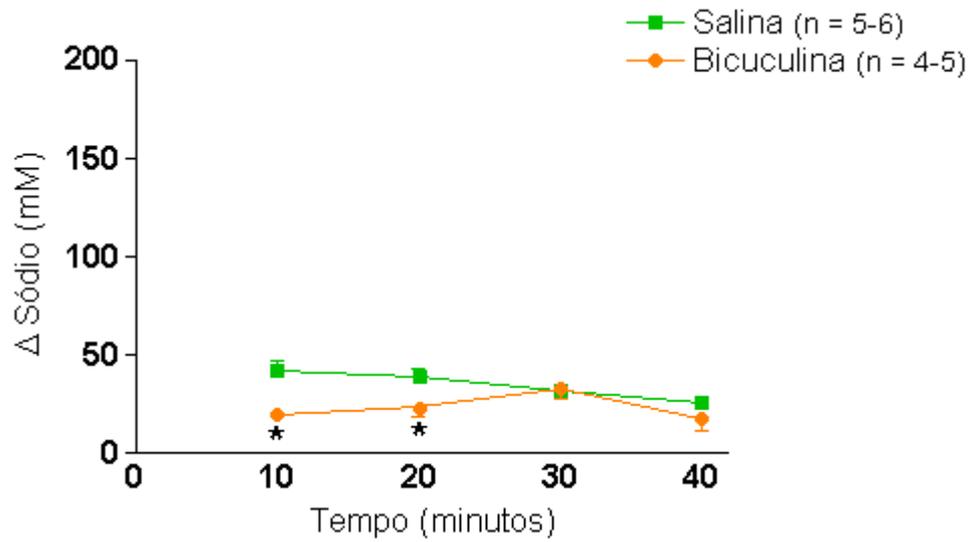


Figura 15: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre a absorção jejunal de sódio. Foi observada diminuição na absorção de sódio nos tempos 10' e 20' quando comparado grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (Tempo 10': * $p < 0,01$; Tempo 20': * $p < 0,05$).

Efeito da estimulação do DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A Figura 16 mostra o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Não houve diferença tanto para glicogênio hepático ($2,8 \pm 0,5$ vs. $1,9 \pm 0,2$ mg/g), quanto para glicogênio muscular ($1,5 \pm 0,3$ vs. $1,4 \pm 0,3$ mg/g) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina no mesmo local.

Efeito da estimulação do DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose

Na Figura 17, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose. Não houve diferença quando comparados os animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) no mesmo local: 0' ($6,6 \pm 0,4$ vs. $6,2 \pm 0,3$ mM); 15' ($6,1 \pm 0,3$ vs. $6,5 \pm 0,9$ mM) e 40' ($6,0 \pm 0,6$ vs. $7,2 \pm 0,6$ mM).

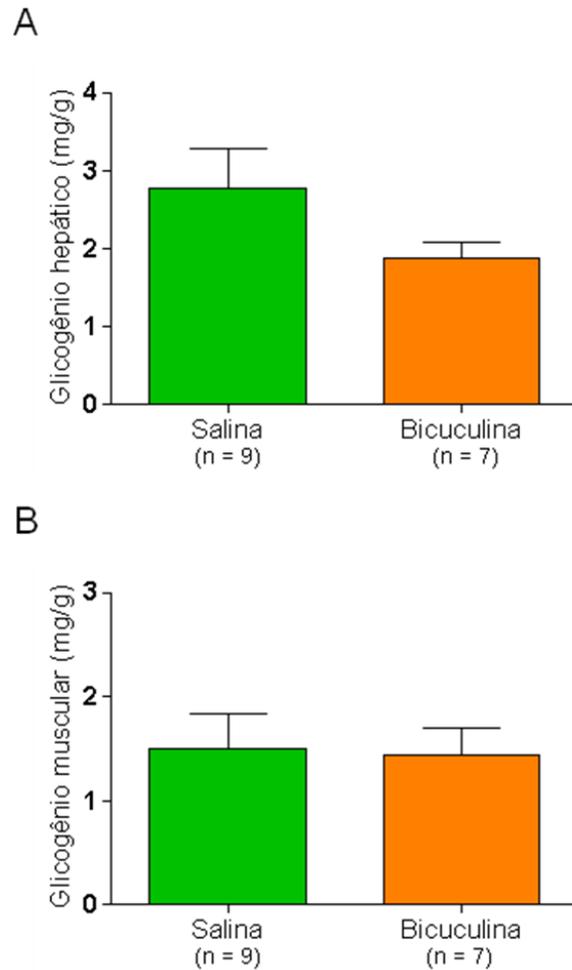


Figura 16: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B). Não houve diferença no conteúdo de glicogênio hepático ou muscular quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local.

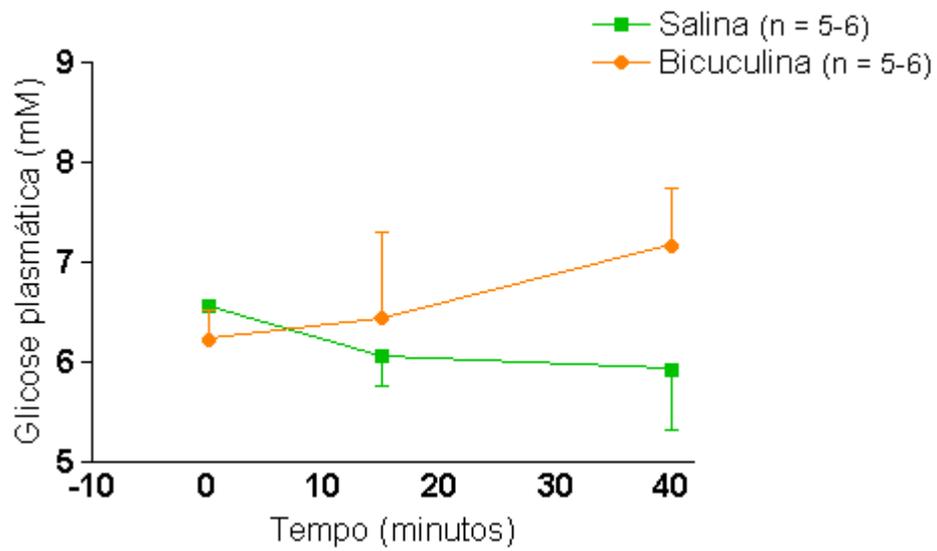


Figura 17: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de glicose quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local.

Efeito da estimulação do DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina

A Figura 18 mostra o efeito da BMI (10pmol/100nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina. Esta foi aferida apenas no tempo de 15 minutos após o início de perfusão do Tyrode 2. Os níveis séricos de insulina apresentaram-se aumentados ($0,2 \pm 0,04$ vs. $0,4 \pm 0,05$ ng/mL) ($p < 0,05$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9% /100 nL) no mesmo local.

Efeito da estimulação do DMH sobre metabólitos hepáticos e musculares

Na Figura 19, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10pmol/100nL) no DMH sobre o conteúdo hepático e muscular dos metabólitos via glicolítica G-6-P, F-6-P e ATP. No fígado houve diminuição da G-6-P ($0,011 \pm 0,002$ vs. $0,002 \pm 0,001$ $\mu\text{mol/g}$) ($p < 0,05$) quando comparados animais que receberam BMI com aqueles que receberam salina (0,9%/100 nL) na mesma região. Para os demais metabólitos hepáticos não ocorreu diferença entre os grupos salina e BMI: F-6-P ($0,008 \pm 0,002$ vs. $0,003 \pm 0,001$ $\mu\text{mol/g}$) e ATP ($0,011 \pm 0,002$ vs. $0,008 \pm 0,002$ $\mu\text{mol/g}$), respectivamente.

No músculo, ocorreu aumento da G-6-P ($0,201 \pm 0,051$ vs. $0,427 \pm 0,099$ $\mu\text{mol/g}$) ($p < 0,05$) dos animais que receberam BMI quando comparados com aqueles que receberam salina no mesmo local. Não houve alteração para os demais metabólitos F-6-P ($0,046 \pm 0,009$ vs. $0,034 \pm 0,005$ $\mu\text{mol/g}$) e ATP ($0,023 \pm 0,006$ vs. $0,029 \pm 0,007$ $\mu\text{mol/g}$) quando comparados os grupos salina e BMI.

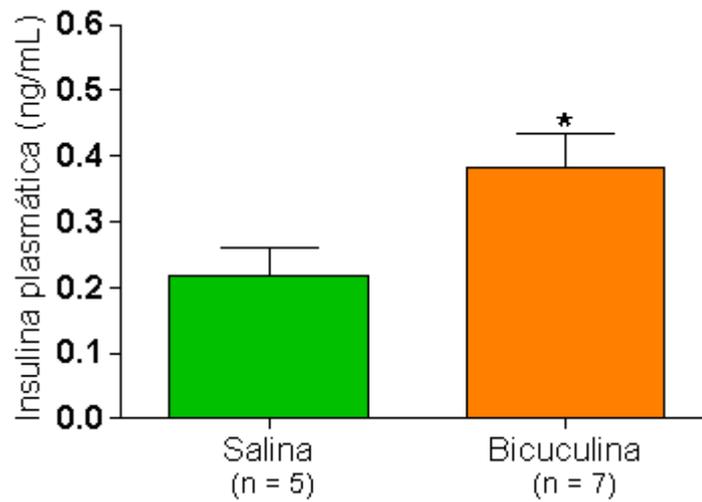


Figura 18: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina. Houve aumento dos níveis séricos de insulina quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (* $p < 0,05$).

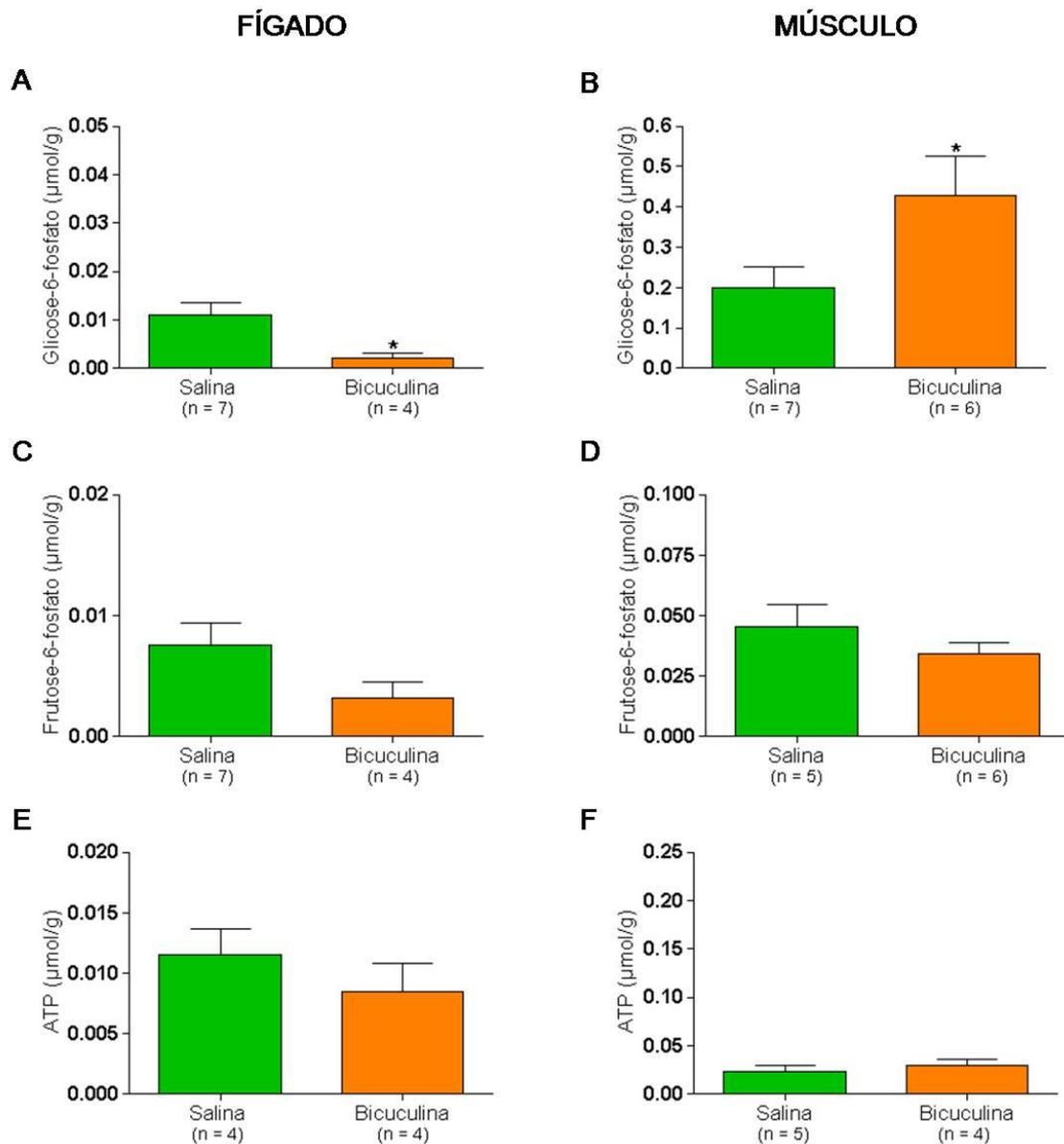


Figura 19: Efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre o conteúdo de metabólitos da via glicolítica glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e ATP no fígado (A,C e E) e músculo (B, D e F). Houve diminuição da G-6-P hepática, e aumento do mesmo metabólito no músculo quando comparado o grupo que recebeu BMI com aquele que recebeu salina no mesmo local (*p<0,05).

Locais das microinjeções de BMI e salina no DMH

A Figura 20 mostra os locais das microinjeções nos animais que receberam BMI ou salina no DMH.

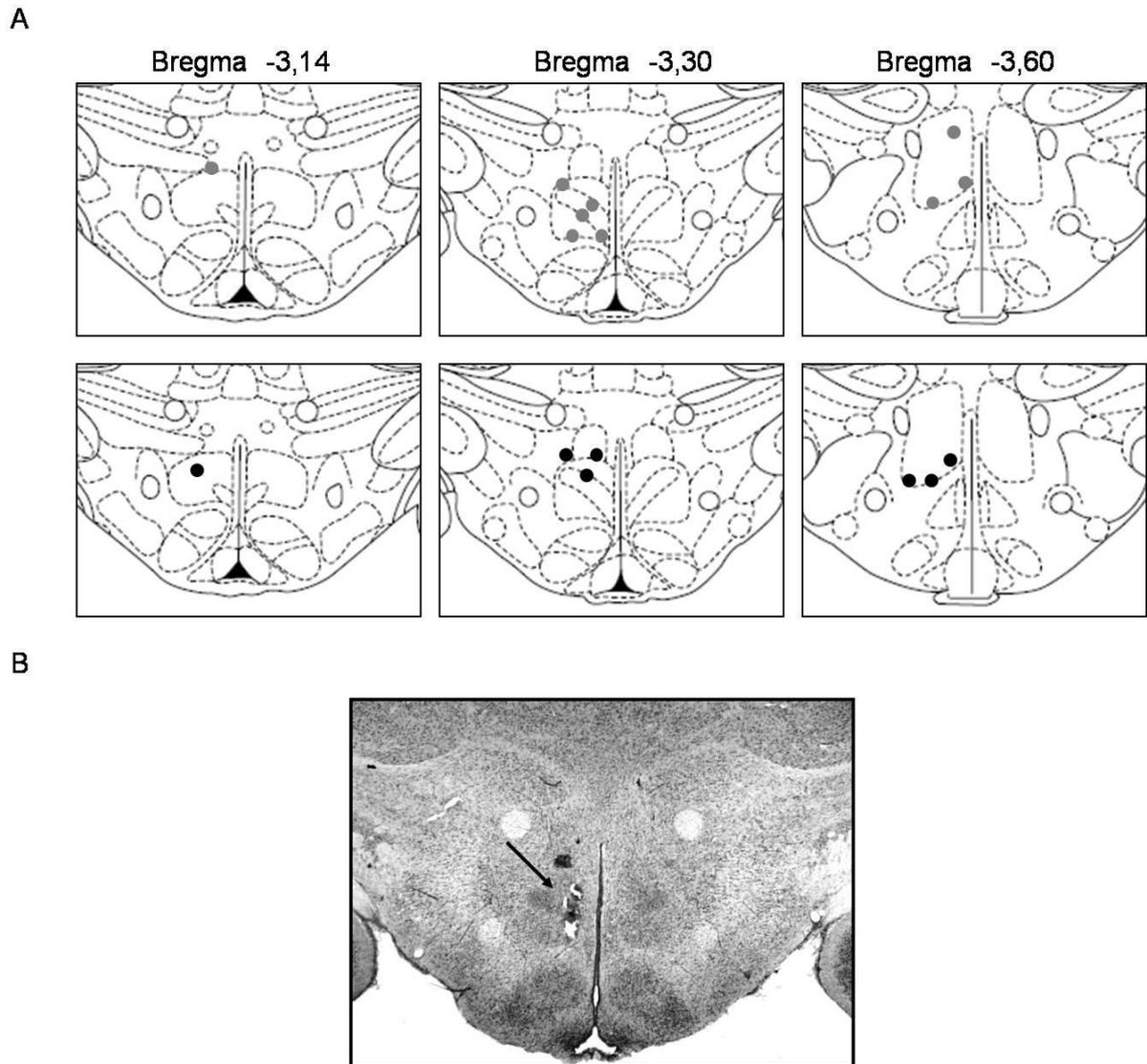


Figura 20: (A) Representação esquemática dos cortes coronais do DMH mostrando os locais da microinjeção da salina (círculo cinza n = 9) e BMI (círculo preto, n = 7). (B) Fotomicrografia de um corte transversal do cérebro do rato mostrando um sítio de microinjeção unilateral no DMH. Seta indica local da microinjeção.

3 - Comparação dos Resultados Encontrados entre os Núcleos Paraventricular e Dorsomedial do Hipotálamo

Comparação da desinibição do PVN e DMH sobre os parâmetros cardiovasculares

Na Figura 21 observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre os parâmetros cardiovasculares. A mesma dose de BMI provocou resposta pressórica ($\Delta 5 \pm 1$ vs. 13 ± 4 mmHg) ($p < 0,05$) e taquicárdica ($\Delta 17 \pm 3$ vs. 141 ± 21 bpm) ($p < 0,001$) maior no DMH quando comparado ao PVN.

Comparação da desinibição do PVN e DMH sobre a absorção jejunal de glicose

Na Figura 22, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre a absorção de glicose, expressa pela diferença de concentração da glicose presente no influxo e efluente. A absorção de glicose foi menor nos tempos de 20' ($0,042 \pm 0,003$ vs. $0,029 \pm 0,005$ mM) ($p < 0,05$), 30' ($0,035 \pm 0,003$ vs. $0,024 \pm 0,007$ mM) ($p < 0,05$) e 40' ($0,037 \pm 0,003$ vs. $0,019 \pm 0,004$ mM) ($p < 0,01$) quando comparados os animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN. No tempo 10' ($0,031 \pm 0,003$ vs. $0,028 \pm 0,003$ mM) não ocorreu diferença na absorção da glicose entre os grupos que receberam BMI no PVN e DMH.

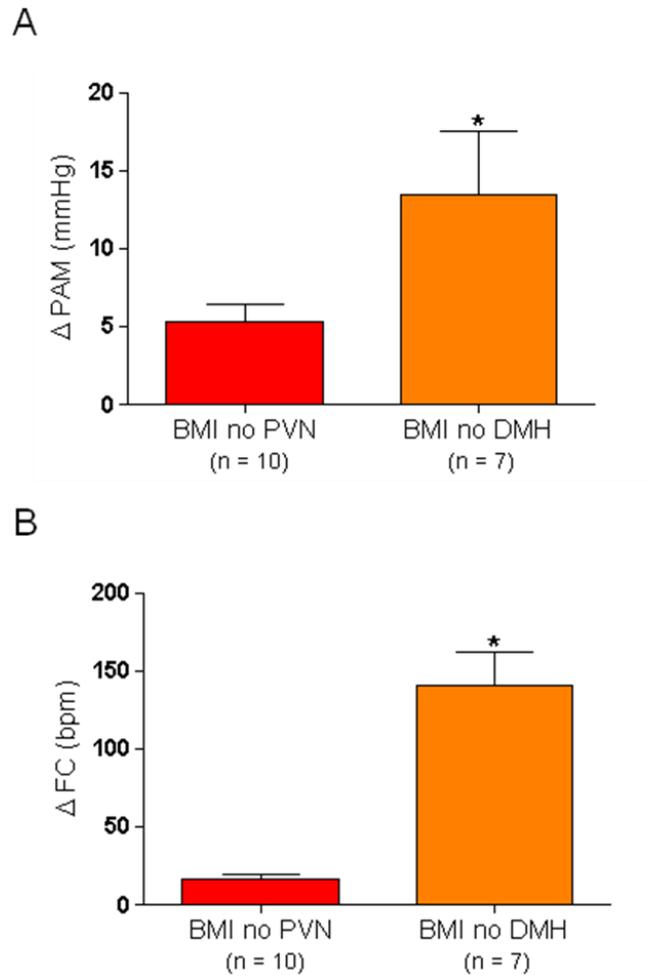


Figura 21: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B). Houve aumento da PAM e da FC quando comparado o grupo que recebeu BMI no DMH com aquele que recebeu a mesma droga no PVN (PAM: * $p < 0,05$; FC: * $p < 0,001$).

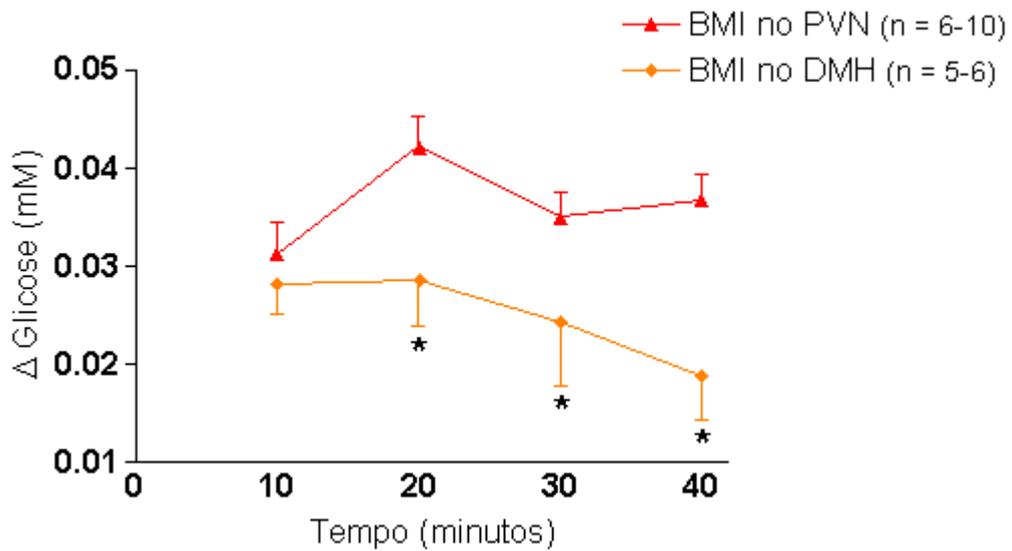


Figura 22: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre a absorção jejunal de glicose. A absorção de glicose foi menor nos tempos de 20', 30' e 40' no grupo que recebeu BMI no DMH quando comparado com aquele que recebeu a mesma droga no PVN (Tempo 20': * $p < 0,05$; Tempo 30': * $p < 0,05$ e Tempo 40': * $p < 0,01$).

Comparação da estimulação do PVN e DMH sobre a absorção jejunal de sódio

Na Figura 23, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre a absorção jejunal de sódio, expressa pela diferença de concentração do sódio presente no influxo e efluente. Foi observada menor absorção de sódio nos tempos de 20' ($50,2 \pm 21,2$ vs $23,5 \pm 4,6$ mM) ($p < 0,05$), 30' ($105,6 \pm 21,2$ vs $32,9 \pm 4,5$ mM) ($p < 0,05$) e 40' ($122,9 \pm 31,3$ vs $18,3 \pm 6,3$ mM) ($p < 0,05$) quando comparado animais que receberam BMI no DMH, com aqueles que receberam a mesma droga no PVN. No tempo 10' ($66,5 \pm 30,2$ vs $42,3 \pm 4,7$ mM) não ocorreu diferença na absorção de sódio entre os grupos que receberam BMI no PVN ou no DMH.

Comparação da estimulação do PVN e DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A Figura 24 mostra o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Houve diminuição do glicogênio hepático quando comparados animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN ($3,2 \pm 0,4$ vs $1,9 \pm 0,2$ mg/g) ($p < 0,05$).

Não houve diferença no conteúdo de glicogênio muscular ($1,7 \pm 0,2$ vs $1,4 \pm 0,3$ mg/g) quando comparados animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN.

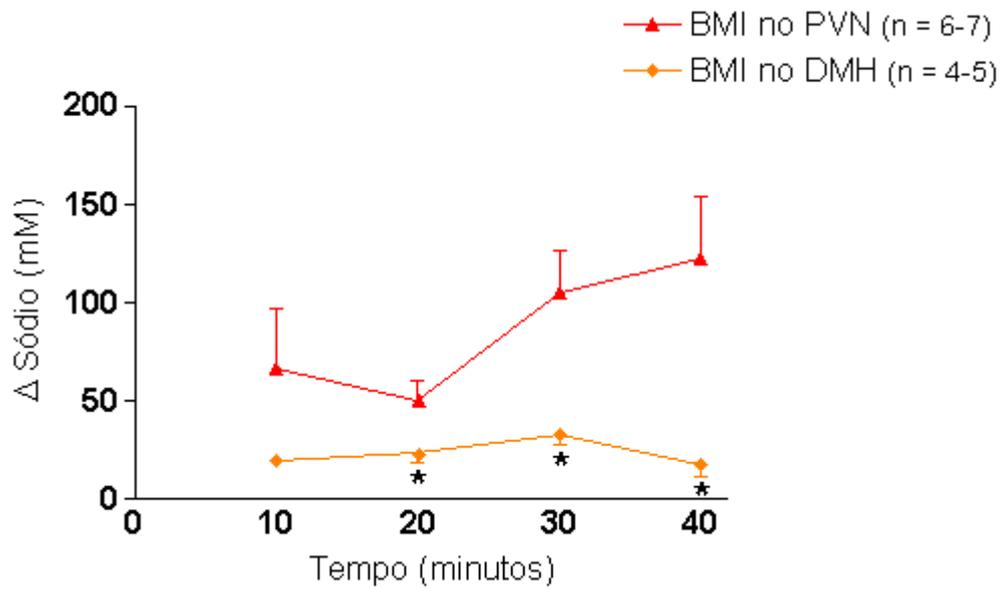
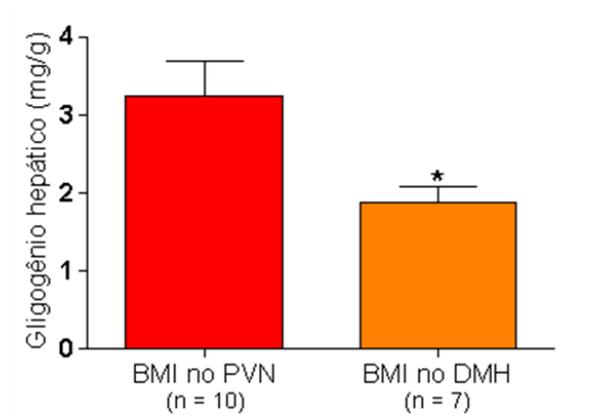


Figura 23: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre a absorção jejunal de sódio. Foi observada menor absorção de sódio nos tempos 20', 30' e 40' quando comparado o grupo que recebeu BMI no DMH com aquele que recebeu a mesma droga no PVN (Tempos 20',30' e 40': *p<0,05).

A



B

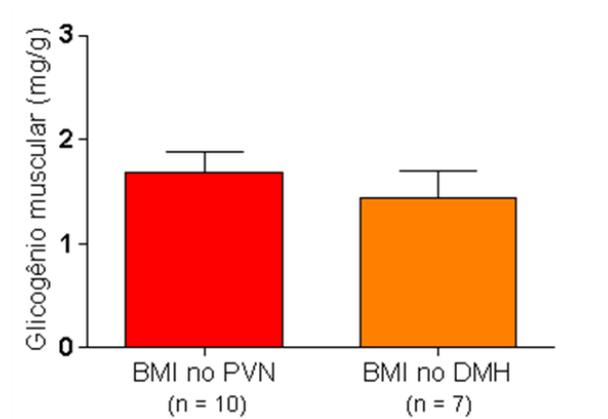


Figura 24: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático (A) e muscular (B). Houve diminuição do conteúdo de glicogênio hepático quando comparado o grupo que recebeu BMI no DMH com aquele que recebeu a mesma droga no PVN. Não ocorreu diferença entre os grupos para glicogênio muscular ($p < 0,05$).

Comparação da estimulação do PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose

Na Figura 25, observa-se o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose. Não houve alteração da glicose plasmática quando comparados os animais que receberam BMI no PVN ou DMH para todos os tempos: 0' ($6,8 \pm 0,3$ vs. $6,2 \pm 0,3$ mM), 15' ($6,2 \pm 0,2$ vs. $6,5 \pm 0,9$ mM), 40' ($7,1 \pm 0,4$ vs. $7,2 \pm 0,6$ mM).

Comparação da estimulação do PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina

Observa-se na figura 26, o efeito da microinjeção de BMI no PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina. Não houve alteração da insulina sérica quando comparado os animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN ($0,3 \pm 0,04$ vs. $0,4 \pm 0,05$ ng/mL).

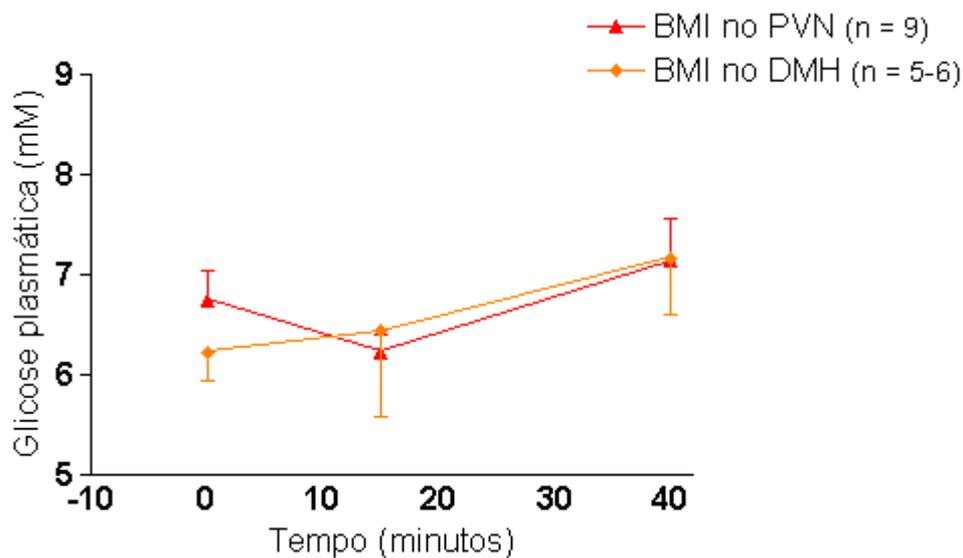


Figura 25: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose. Não ocorreu diferença nos níveis séricos de glicose quando comparado o grupo que recebeu BMI no DMH com aquele que recebeu a mesma droga no PVN.

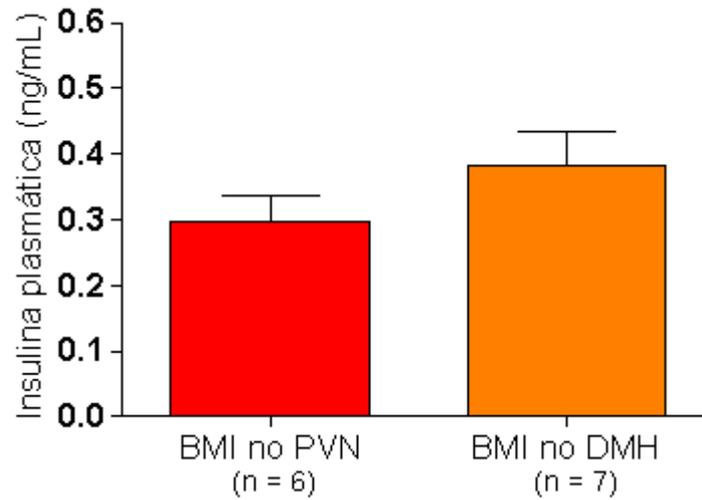


Figura 26: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina. Não ocorreu diferença nos níveis séricos de insulina, quando comparado o grupo que recebeu BMI no DMH com aquele que recebeu a mesma droga no PVN.

Comparação da estimulação do PVN e DMH sobre metabólitos hepáticos e musculares

Na Figura 27, pode ser observado o efeito da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre o conteúdo dos metabólitos via glicolítica G-6-P, F-6-P e ATP. No fígado houve diminuição da G-6-P ($0,033 \pm 0,008$ vs. $0,002 \pm 0,001$ mol/g) ($p < 0,05$) e F-6-P ($0,016 \pm 0,004$ vs. $0,003 \pm 0,001$ μ mol/g) ($p < 0,05$) e aumento do ATP ($0,003 \pm 0,001$ vs. $0,008 \pm 0,002$ μ mol/g) ($p < 0,05$) quando comparados animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN.

No músculo, foi observada diminuição da F-6-P ($0,066 \pm 0,008$ vs. $0,034 \pm 0,005$ μ mol/g) ($p < 0,05$) quando comparados os animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN. Não foram observadas diferenças na G-6-P ($0,253 \pm 0,020$ vs. $0,427 \pm 0,099$ μ mol/g) e ATP ($0,038 \pm 0,013$ vs. $0,029 \pm 0,007$ μ mol/g) entre os grupos que receberam BMI no DMH ou PVN.

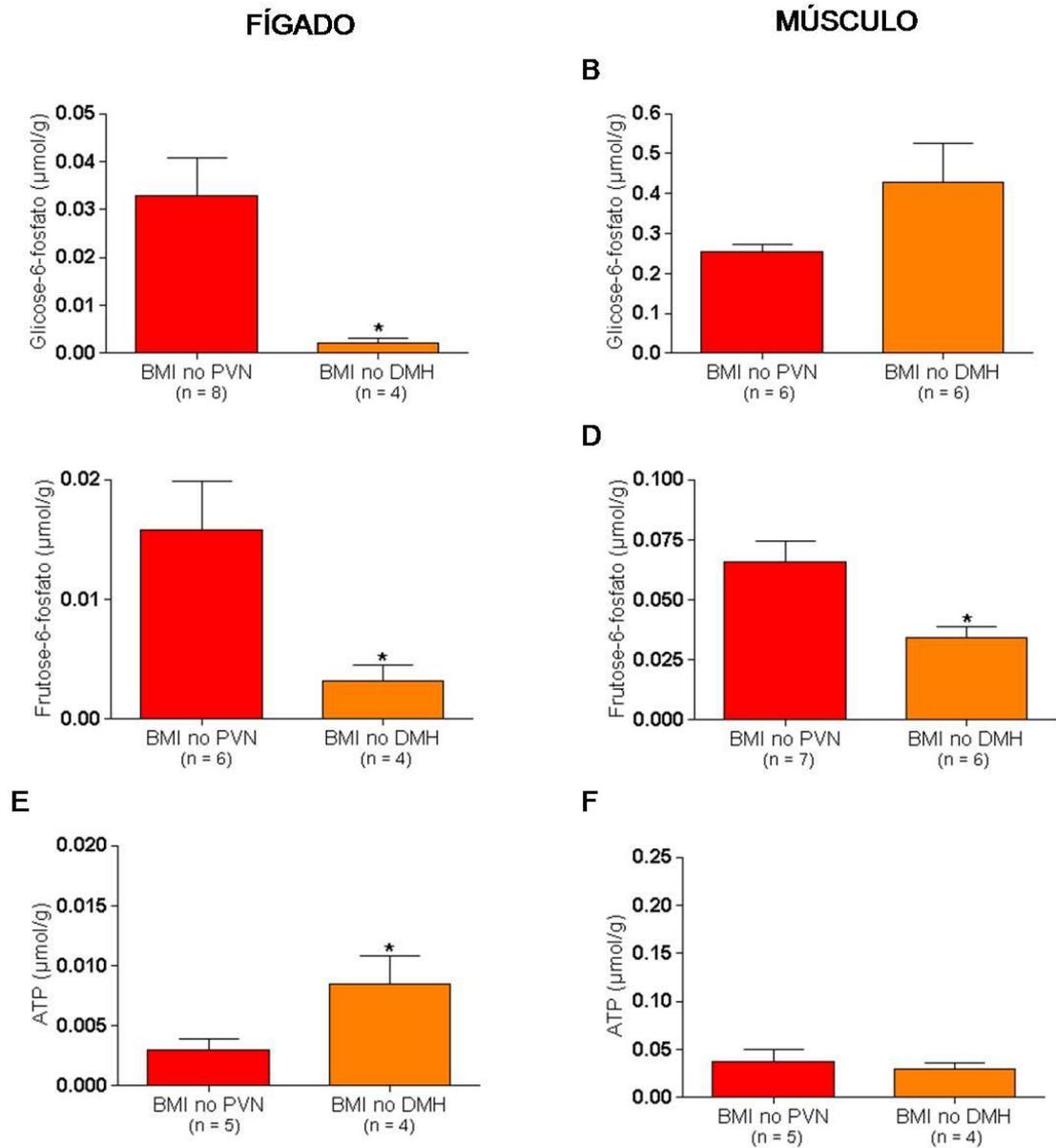


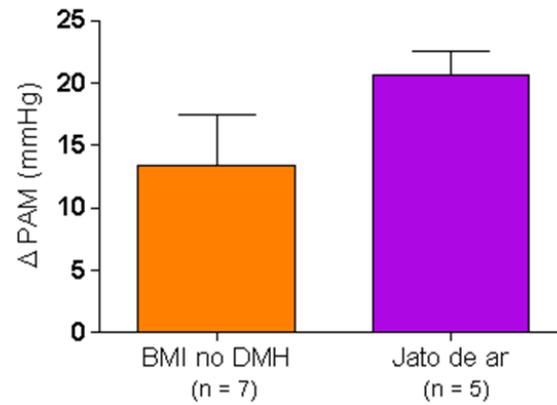
Figura 27: Efeito comparativo da microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no PVN e DMH sobre o conteúdo de metabólitos da via glicolítica glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e ATP no fígado (A,C e E) e músculo (B, D e F). Houve aumento da G-6-P, F-6-P e ATP hepático e diminuição da F-6-F muscular quando comparados animais que receberam BMI no DMH com aqueles que receberam a mesma droga no PVN (G-6-P, F-6-P e ATP hepáticos * $p < 0,05$; F-6-P muscular $p < 0,01$).

4 - Estresse por Jato de Ar

Comparação do efeito do estresse por jato com a desinibição do DMH sobre os parâmetros cardiovasculares

Na Figura 28, observa-se a comparação da PAM e FC entre os animais que receberam salina (0,9%/100 nL) no DMH e foram subsequentemente submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que receberam microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH. Animais submetidos ao estresse por jato de ar não apresentaram alterações de PAM (13 ± 4 vs. 20 ± 2 mmHg) e FC (141 ± 21 vs. 182 ± 10 mmHg) quando comparados com aqueles que receberam BMI no DMH.

A



B

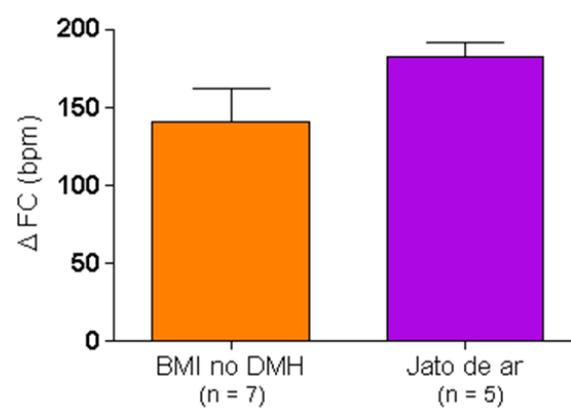


Figura 28: Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B). Não houve diferença da PAM e FC quando comparado animais submetidos ao estresse com aqueles que receberam BMI no DMH.

Comparação do efeito do estresse por jato de ar com a desinibição do DMH sobre a absorção jejunal de glicose

A Figura 29 mostra a comparação da absorção jejunal de glicose, expressa pela diferença de concentração da glicose presente no influxo e efluente entre os animais que receberam salina (0,9%/100 nL) no DMH e foram, subseqüentemente, submetidos ao estresse por jato de ar, com aqueles que receberam BMI (10 pmol/100 nL) no DMH. Não houve alteração na absorção de glicose, em nenhum dos tempos: 10' ($0,028 \pm 0,003$ vs. $0,023 \pm 0,006$ mM), 20' ($0,029 \pm 0,005$ vs. $0,030 \pm 0,008$ mM), 30' ($0,024 \pm 0,007$ vs. $0,032 \pm 0,005$ mM) 40' ($0,019 \pm 0,004$ vs. $0,028 \pm 0,005$ mM) quando comparados animais submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que tiveram o DMH desinibido.

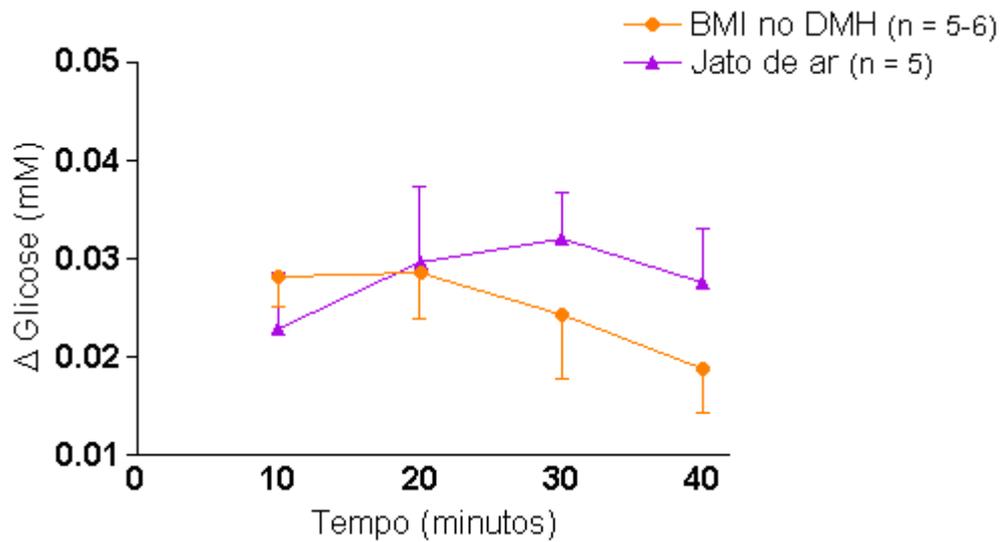


Figura 29: Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre a absorção jejunal de glicose. Não houve diferença na absorção de glicose quando comparados os animais submetidos ao estresse com aqueles que receberam BMI no DMH.

Comparação do efeito do estresse por jato de ar com a desinibição do DMH sobre a absorção jejunal de sódio

Na Figura 30, observa-se a absorção jejunal de sódio, expressa pela diferença de concentração do sódio presente no influxo e efluente dos animais que receberam salina (0,9%/ 100 nL) e foram subseqüentemente submetidos ao estresse por jato de ar comparado com aqueles que receberam microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH. Animais submetidos ao estresse por jato de ar apresentaram aumento na absorção de sódio nos tempos 10' ($19,6 \pm 2,2$ vs. $83,4 \pm 6,1$ mM) ($p < 0,001$), 20' ($23,5 \pm 4,6$ vs. $82,8 \pm 4,4$ mM) ($p < 0,001$), 30' ($32,9 \pm 4,5$ vs. $84,6 \pm 2,4$ mM) ($p < 0,001$) e 40' ($18,3 \pm 6,3$ vs. $87,7 \pm 5,8$ mM) ($p < 0,001$) quando comparados aos animais que receberam BMI no DMH.

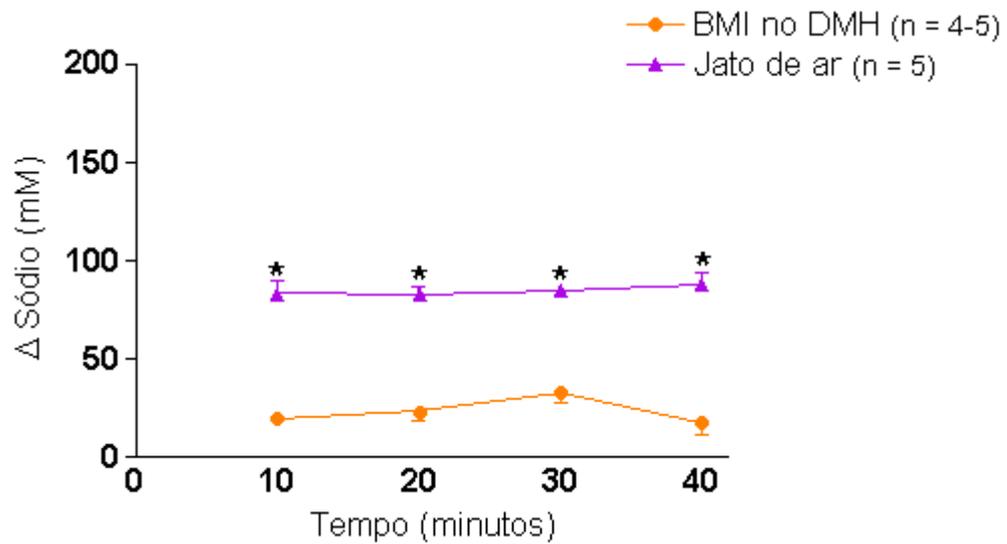


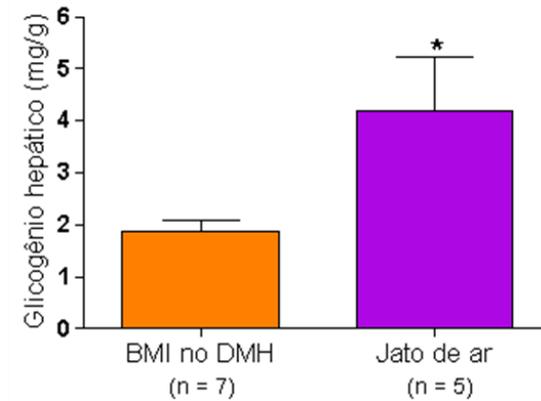
Figura 30: Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI no DMH (10 pmol/100 nL) sobre a absorção jejunal de sódio. Houve aumento na absorção de sódio em todos os tempos quando comparados os animais submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que receberam BMI no DMH (Tempo 10', 20', 30' e 40': *p<0,001)

Comparação do efeito do estresse por jato de ar com a desinibição do DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A Figura 31 mostra a comparação do conteúdo hepático e muscular de glicogênio entre os animais que receberam salina (0,9%/100 nL) no DMH e foram, subsequentemente, submetidos ao estresse por jato de ar com os que receberam BMI (10 pmol/100 nL) no DMH. O conteúdo de glicogênio hepático dos animais submetidos ao estresse por jato de ar apresentou-se aumentado ($1,9 \pm 0,2$ vs. $4,2 \pm 1,0$ mg/g) ($p < 0,05$) quando comparado com o daqueles que receberam BMI no DMH.

Não ocorreu diferença no conteúdo de glicogênio muscular ($1,4 \pm 0,2$ vs. $1,6 \pm 0,4$ mg/g) quando comparados os animais submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que receberam BMI no DMH.

A



B

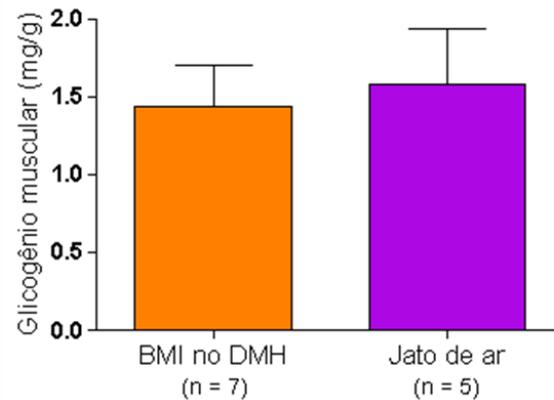


Figura 31: Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Os animais submetidos ao estresse por jato de ar apresentaram conteúdo de glicogênio hepático aumentado quando comparados aos que receberam BMI no DMH. Não houve diferença entre os grupos para o glicogênio muscular (* $p < 0,05$).

Comparação dos efeitos do estresse por jato de ar com a desinibição do DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose

Na Figura 32, observa-se o efeito comparativo dos níveis plasmáticos de glicose dos animais que receberam microinjeção de salina (0,9%/100 nL) no DMH e foram, subseqüentemente, submetidos ao estresse por jato com aqueles que receberam microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH. Não ocorreu alteração dos níveis séricos de glicose quando comparado o grupo submetido ao estresse por jato de ar com aquele que recebeu microinjeção de BMI no DMH: 0' ($6,2 \pm 0,3$ vs. $6,2 \pm 0,4$ mM); 15' ($6,5 \pm 0,9$ vs. $6,4 \pm 0,4$ mM) e 40' ($7,2 \pm 0,6$ vs. $6,3 \pm 0,5$ mM).

Comparação dos efeitos do estresse por jato de ar com a desinibição do DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina

Observa-se na Figura 33, o efeito comparativo dos níveis plasmáticos de insulina dos animais que receberam salina (0,9%/100 nL) no DMH e foram, subseqüentemente, submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que receberam BMI no DMH. Não ocorreu alteração nos níveis séricos de insulina quando comparados os animais submetidos ao estresse com aqueles que receberam BMI no DMH ($0,4 \pm 0,05$ vs. $0,4 \pm 0,02$ ng/mL).

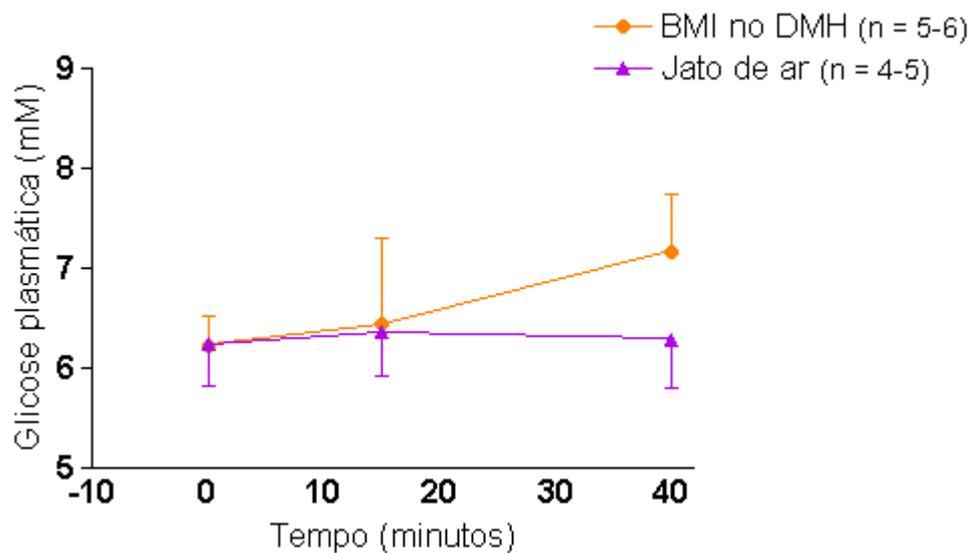


Figura 32: Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de glicose. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de glicose quando comparados os animais submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que receberam BMI no DMH.

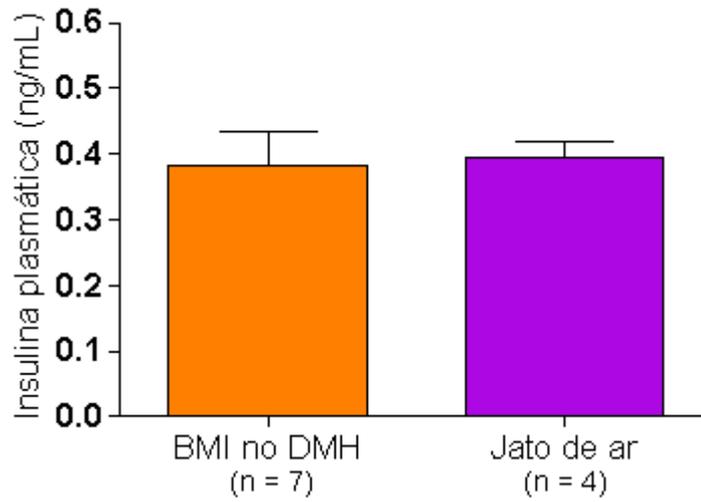


Figura 33: Efeito do estresse por jato de ar comparado com a microinjeção de BMI (10 pmol/100 nL) no DMH sobre os níveis plasmáticos de insulina. Não houve diferença nos níveis séricos de insulina quando comparados os animais submetidos ao estresse por jato de ar com aqueles que receberam BMI no DMH.

Locais das microinjeções de salina no DMH dos animais submetidos ao estresse por jato de ar

A figura 34 mostra os locais das microinjeções de salina no DMH dos animais submetidos ao estresse por jato de ar.

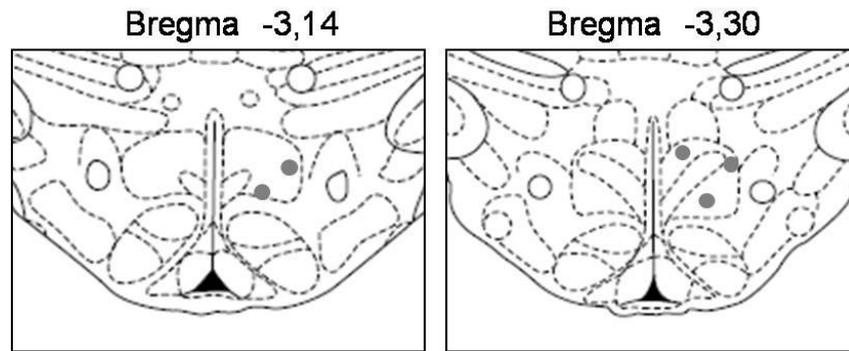


Figura 34: Representação esquemática dos cortes coronais mostrando os locais da microinjeção de salina no DMH dos animais submetidos ao estresse por jato de ar.

V - DISCUSSÃO

No presente estudo, registros dos parâmetros cardiovasculares foram utilizados como uma ferramenta adicional para a localização do PVN e DMH, uma vez que, já estão bem estabelecidos na literatura os efeitos da estimulação química desses núcleos sobre PAM e FC.

Estudos anteriores corroboram com achados do presente trabalho, onde foi observado aumento da pressão arterial e frequência cardíaca após a microinjeção de BMI no PVN e DMH (MARTIN; HAYWOOD, 1991,1993; SCHELENKER *et al.*, 2001; DIMICCO *et al.*, 1996; DA SILVA *et al.*, 2003, 2006). A inibição do tônus gabaérgico que atua sobre PVN e DMH provoca uma resposta simpatoexcitatória (KANAAN *et al.*, 1989; MARTIN *et al.*, 1991 MARTIN; HAYWOOD, 1992; STOTZ POTTER *et al.*, 1996; FONTES *et al.*, 2001) responsável pela alteração dos parâmetros cardiovasculares encontradas no presente estudo.

1 - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

Pôde-se observar no presente trabalho, aumento da absorção jejunal de glicose. Estudos (SHEPHERD *et al.*, 2004; BOUDRY *et al.*, 2007; HELLIWELL, *et al.*, 2003) têm citado alterações na expressão de GLUT2 na membrana apical de animais submetidos ao estresse. No entanto, em nenhum dos trabalhos citados foi verificada mudança na expressão do SGLT1. Este transportador, é o componente ativo da absorção de glicose, seu Km é aparentemente de 8-23 mM, começando a saturar por volta de 30-50 mM, já o GLUT2 é o componente passivo da absorção de glicose, não apresentando saturação até em concentrações maiores que 100 mM (KELLETT; HELLIWELL, 2000). Considerando que a concentração da glicose no Tyrode 2 é de 10 mM, é possível sugerir que no presente estudo a absorção elevada de glicose foi mediada pelo receptor SGLT1.

Foi observado um aumento na absorção de Na⁺. Este eletrólito é absorvido no jejuno e íleo através de diferentes transportadores. No presente estudo, ocorreu aumento pronunciado na absorção de Na⁺ quando comparado à glicose. Este aumento pode ter ocorrido devido a absorção aumentada de glicose, via SGLT1, e adicionalmente pelas outras formas de absorção do Na⁺, o co-transportador Na⁺:Cl⁻ e o trocador Na⁺-H⁺.

Não foram observadas alterações glicêmicas, no presente estudo. Trabalhos prévios de KALSBECK *et al.*, em 2004 demonstraram que a microinjeção contínua de BMI no PVN desencadeia hiperglicemia causada por um aumento na produção hepática de glicose. IONESCU *et al.*, 1989 também verificaram que a estimulação do PVN com norepinefrina provocou um

aumento da glicemia. No entanto, em estudo de YAMADA *et al.*, 1993 animais que estavam a 18 horas de jejum apresentaram hiperglicemia apenas 60 minutos após estarem submetidos a um modelo de estresse (estresse por contenção). Os resultados do presente trabalho não corroboram com estudos prévios onde ocorreu estimulação direta do PVN. Possivelmente isso pode ter ocorrido devido a diferença entre os protocolos utilizados nos trabalhos citados e no presente estudo.

Embora tenha ocorrido um aumento evidente da absorção de glicose, não ocorreu o seu aparecimento na corrente sanguínea, o que pode ter ocorrido devido ao balanço entre o aparecimento da glicose na corrente sanguínea e sua captação pelos tecidos periféricos.

Não foram observadas alterações no conteúdo de glicogênio e metabólitos (glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ATP) hepáticos no presente estudo. Em trabalho já citado de YAMADA *et al.*, 1993 foi demonstrado que animais em jejum, submetidos ao estresse, não apresentavam alteração no conteúdo de glicogênio hepático. No mesmo estudo, animais que tiveram livre acesso à comida apresentaram diminuição nos níveis de glicogênio hepático quando submetidos ao estresse. Os resultados do presente trabalho corroboram com os dados de YAMADA *et al.*, 1993, embora no trabalho destes autores o estímulo estressor tenha sido contínuo. Possivelmente a não alteração dos níveis de glicogênio hepático pode ter ocorrido, devido ao fato de os animais de ambos os grupos (controle e que receberam BMI) se encontrarem a algum tempo sob jejum.

Embora no presente trabalho não tenha sido observado alteração no conteúdo de glicogênio muscular foi verificada diminuição da glicose-6-fosfato e

ATP no músculo gastrocnêmio. No músculo esquelético, a glicose é utilizada apenas para suprir energia para o próprio órgão ou ser estocada sob a forma de glicogênio. Os resultados encontrados sugerem uma ativação prévia da via glicolítica no músculo, o que poderia levar ao consumo de glicose-6-fosfato e ATP, conseqüentemente, diminuindo a quantidade destes metabólitos no músculo. O aumento do lactato plasmático nos tempos de 15 e 40 minutos após o início da perfusão do Tyrode 2, pode ter ocorrido em virtude do aumento do metabolismo anaeróbico no músculo provocado por uma estimulação simpática prévia. A ativação simpática provoca aumento de catecolaminas que estão correlacionadas positivamente com o aumento de lactato plasmático (FATTOR, *et al.*, 2005).

No mesmo estudo citado anteriormente, YAMADA *et al.*, 1993 demonstraram ainda, aumento nos níveis plasmáticos de epinefrina, norepinefrina, glucagon e diminuição nos níveis de plasmáticos de insulina dos animais em jejum submetidos ao estresse. No estado pós-prandial quando glicose sanguínea e insulina estão aumentadas, a utilização e armazenamento de glicose são priorizados, enquanto no jejum, a utilização e armazenamento da glicose são inibidos por alterações hormonais, como aumento do glucagon. No presente trabalho, os níveis séricos de insulina diminuído no tempo de 15 minutos após o início da perfusão do Tyrode 2 apontam para a possibilidade de o animal se encontrar em um estado catabólico, onde hormônios como glucagon e catecolaminas, associados à resposta ao estresse estariam em maior concentração priorizando a glicogenólise e gliconeogênese para liberação de suprimento energético para o organismo.

Em trabalho de PEREIRA *et al.*, 2008, foi observado alterações no conteúdo muscular de glicogênio e em metabólitos da via glicolítica de animais submetidos a crise epiléptica. PEREIRA *et al.*, 2008 utilizaram protocolo e intervalo de tempo (entre o estímulo e a coleta das amostras) semelhantes aos do presente estudo, demonstrando dessa forma a adequação do protocolo proposto.

2 - Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

A ativação do DMH provoca alterações semelhantes às aquelas observadas em uma situação de estresse emocional (DIMICCO *et al.*, 1996). Embora já tenha sido demonstrado que situações de estresse ou mesmo ativação do DMH desencadeia alterações no trato gastrointestinal (GREENWOOD; DIMICCO, 1995), no presente estudo não foi observado mudanças na absorção jejunal de glicose. No entanto, foi verificada diminuição na absorção jejunal de sódio nos primeiros 20 minutos de perfusão.

Em situações de estresse são priorizados suplementos energéticos para órgãos como cérebro e músculo, em detrimento de outros como o intestino (PAKAK; PALKOVITZ, 2001), dessa forma atividades que são metabolicamente dispendiosas, como por exemplo, a absorção intestinal, não são priorizadas. Possivelmente, isso explicaria a não alteração da absorção de glicose e diminuição na absorção de sódio. Os achados do presente trabalho corroboram com estudos de BARCLAY; TUNBERG, 1987, 1988, onde foi observado que indivíduos submetidos a estresse emocional ou a um modelo de estresse por dor (*cold-induced stress*), embora apresentassem um aumento de pressão arterial e norepinefrina plasmática, apresentaram uma diminuição na absorção de água, sódio e cloro. De acordo com BARCLAY; TUNBERG, 1987, 1988, o efeito do estresse sobre a absorção diminuída de sódio, cloro e água seria mediado pelo sistema nervoso parassimpático. A microinjeção de BMI no DMH leva a um aumento do fluxo simpático que é responsável pelo aumento da PA e da FC e do fluxo parassimpático que afeta as funções do trato gastrointestinal (GREENWOOD; DIMICCO, 1995).

Estudos de ZAIA *et al.*, 1997 demonstraram a estimulação do DMH por norepinefrina desencadeou uma resposta de hiperglicemia. Esse resultado não corrobora com achados do presente estudo, onde não foi encontrada alteração plasmática de glicose. Possivelmente, alteração glicêmica não foi encontrada devido à diferença entre os protocolos utilizados nos estudos citados e no presente trabalho.

Estudos também citam o efeito do estresse sobre os níveis séricos de insulina. YAMADA *et al.*, 1993 e ZARDOOZ *et al.*, 2006 observaram diminuição nos níveis plasmáticos de insulina de animais submetidos a diferentes modelos de estresse, o que não corrobora com os achados do presente trabalho, uma vez que a estimulação do DMH provocou aumento nos níveis séricos de insulina. Um aumento na insulina plasmática indica captação de glicose pelos tecidos para consumo, provendo energia para o organismo ou armazenamento sob forma de glicogênio.

Embora não tenha ocorrido alteração do glicogênio hepático, o que corrobora com estudo já citado de YAMADA *et al.*, 1993, os animais que receberam BMI no DMH apresentaram glicose-6-fosfato diminuída nesse tecido. Essa alteração pode ter decorrido de uma glicogenólise prévia no fígado, o que levaria a uma liberação de glicose para corrente sanguínea e conseqüente consumo da glicose-6-fosfato.

No presente trabalho, não foi observado alteração no conteúdo de glicogênio muscular. No entanto, houve um aumento significativo na glicose-6-fosfato. O aumento deste metabólito no músculo sugere um aumento da captação da glicose plasmática para o músculo, seja para consumo imediato ou para armazenamento sob forma de glicogênio.

3 - Núcleos Hipotalâmicos Paraventricular e Dorsomedial

No presente trabalho, foi observado diferentes efeitos da microinjeção de BMI na mesma dose, no PVN e DMH. A desinibição do DMH provocou respostas pressoras e taquicárdicas mais exacerbadas quando comparadas às do PVN. A microinjeção de BMI no DMH quando comparada ao PVN levou ainda a uma menor absorção intestinal de glicose e sódio, a diminuição do glicogênio hepático, diminuição na glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato e aumento do ATP hepáticos e diminuição da frutose-6-fosfato muscular.

O sistema nervoso central tem um papel crucial em desencadear e modular uma resposta compensatória padronizada ao estresse. Embora grande número de neurotransmissores e neuropeptídeos sejam ativados em várias regiões cerebrais durante a exposição a um estressor, a especificidade de cada resposta ao estresse existe para otimizar a eficiência do organismo em reestabelecer a homeostase e minimizar possíveis danos ao mesmo (PAKÁK; PALKOVITZ, 2001). Desta forma, a resposta a diferentes estressores é específica (PAKÁK; PALKOVITZ, 2001), podendo ocorrer para cada resposta a participação de diferentes núcleos do sistema nervoso central.

O estresse tem sido freqüentemente associado com alterações gastrointestinais e metabólicas. A resposta inicial de indivíduos e animais ao estresse é ativação do sistema nervoso simpático seguido da rápida secreção de adrenalina pela medula da adrenal. A resposta resultante de luta ou fuga aumenta a mobilização de glicose e gordura e redistribuição do fluxo sanguíneo da pele e intestino para cérebro e músculo (SHEPHERD *et al.*, 2004).

A microinjeção de BMI na mesma dose e volume provocou resultados bastante diferentes entre os núcleos. É importante considerar que cada núcleo apresenta população neuronal e funcionalidade distinta, desse modo podendo desencadear respostas diferentes frente a sua estimulação. De acordo com as respostas encontradas na desinibição do PVN e DMH e levando em consideração algumas respostas observadas durante situações estressoras onde ocorre aumento evidente da pressão arterial e frequência cardíaca (STOTZ-POTTER *et al.*, 1996 a,b), alteração de absorção de glicose e sódio (SHEPHERD *et al.*, 2004 BARCLAY; TUNBERG 1987, 1988) é permitido sugerir que a microinjeção de BMI no DMH desencadeou uma resposta simpatoexcitatória mais exacerbada e duradoura que a provocada no PVN.

4 - Núcleo dorsomedial do hipotálamo e estresse por jato de ar

Animais submetidos ao estresse por jato de ar apresentaram respostas taquicárdica e pressora similares às observadas na estimulação química do DMH por BMI. Esses resultados corroboram com dados da literatura (DIMICCO *et al.*, 1996; STOTZ-POTTER *et al.*, 1996ab) que citam o DMH como um núcleo importante para a resposta cardiovascular ao estresse emocional. DIMICCO *et al.*, 1996 observaram que a microinjeção de muscimol, agonista GABA_A no DMH atenua em 85% a resposta taquicárdica e 68 % a resposta pressora causadas pelo estresse por jato de ar. Já as resposta metabólicas observadas entre os dois grupos apresentaram diferenças.

A ativação de um núcleo é um evento controlado, onde a resposta de demais regiões a um estímulo é minimizada visando o estudo de apenas uma área delimitada. Já a submissão de um animal a um modelo de estresse, como no jato de ar, envolve um grande número de estruturas que em conjunto atuam para elaboração da resposta a um estressor.

Dessa forma, vistas as diferenças entre os modelos utilizados no presente estudo é possível sugerir que o DMH atua de forma decisiva na constituição da resposta cardiovascular ao estresse emocional.

VII - CONCLUSÃO

	BMI no PVN	BMI no DMH
PA	↑	↑
FC	↑	↑
Absorção intestinal de glicose	↑	→
Absorção intestinal de sódio	↑	↓
Glicogênio hepático	→	→
Glicogênio muscular	→	→
Glicose plasmática	→	→
Lactato plasmático	↑	—
Insulina plasmática	↓	↑
G-6-P hepática	→	↓
F-6-P hepática	→	→
ATP hepático	→	→
G-6-P muscular	↓	↑
F-6-P muscular	→	→
ATP muscular	↓	→

↑ aumentou

↓ diminuiu

→ não alterou

— não foi dosado

Na resposta ao estresse, ajustes metabólicos são feitos com intuito de melhorar o desempenho frente a um estressor e garantir a sobrevivência do

indivíduo. Durante a resposta ao estresse agudo, são necessários, processos fisiológicos para redirecionar a utilização de energia entre os vários órgãos e seletivamente inibir ou estimular sistemas orgânicos. Certos tecidos tendem a reduzir seu consumo energético, enquanto outros como o sistema nervoso central e àqueles que são importantes para a atividade locomotora recebem aporte energético maior. O aumento energético para esses órgãos ocorre pela liberação de catecolaminas e glicocorticóides, que em geral aumentam gliconeogênese e glicogenólise, inibindo a captação de glicose e aumentando proteólise e lipólise (PAKÁK; PALKOVITZ, 2001). Dessa forma durante uma situação de estresse funções intestinais, como a absorção, não são priorizadas.

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que o PVN e o DMH são núcleos que participam da organização central das respostas cardiovasculares e neuroendócrinas ao estresse. No entanto, a participação de cada núcleo é peculiar. Ambos os núcleos apresentaram respostas cardiovasculares e metabólicas quando desinibidos.

Embora tenha sido utilizada a mesma dose de BMI para estimular PVN e DMH a resposta apresentada por ambos os núcleos foi diferente. A microinjeção de BMI parece ter provocado uma resposta simpatoexcitatória maior e mais duradoura no DMH que no PVN.

Dessa forma, pode-se concluir que a ativação do PVN e DMH provoca alterações cardiovasculares e metabólicas relevantes. Embora DMH esteja mais envolvido na resposta cardiovascular e o PVN na absorção intestinal, estes núcleos fazem parte de um circuito central que participa das respostas metabólicas exigidas, durante uma situação de estresse.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 28, p.95-99, 2001.

BAILEY, T.W.; DIMICCO, J.A. Chemical stimulation of dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *American Journal Physiology*. v. 280, p. R8-R15, 2001.

BARCLAY, G. R.; TUNBERG, L. A. Effect of psychological stress on salt and water transport in human jejunum. *Gastroenterology* . v. 93, p. 91-97, 1987.

BARCLAY, G. R.; TUNBERG, L. A. Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology* . v. 94, p. 994-998, 1988.

BARD, P. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *American Journal Physiology*. v. 84, p. 490-515, 1928.

BERNARDIS, L.L.; BELLINGER, L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*. v. 218, p. 284-306, 1998.

BHATIA, V.; TANDON, R.K. Stress and the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. v. 20, p. 332-339, 2005.

BLAIR, M.L.; PIEKUT, D.; WANT A.; OLSCHWKA J.A. Role of hypothalamic paraventricular in cardiovascular regulation. *Clinical e Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 23, p. 161-165, 1996.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Fisiologia. 5^o edição. *Elsevier*. 2004.

BORGES, E.L.; BRAGA, A.A.; PETROIANU, A. Influence of obstructive jaundice on jejunal absorption of glucose, electrolytes, and vitamin A in rats. *Digestive Disease and Science*. v.43, p. 2196-2200, 1998.

BORGES, E.L.; MACHADO, A.D.C.V.; HAIBARA, A.S.; PETROIANU, A. Effects of vasoactive intestinal polypeptide microinjected into the nucleus tractus solitarius on jejunal glucose absorption in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. v. 107, p.111-113, 2003.

BOUDRY, G.; CHESSEMAN, C.I.; PERDUE, M.A. Psychological stress impairs Na⁺ - dependent glucose absorption and increase GLUT2 expression in the rat jejunal brush-border membrane. *American Journal of Physiology*.v. 292, p.862-867, 2007.

CALAHAN, M.F.; KIRBY, R.F.; CUNNINGHAM, J.T.; ESKRIDGE-SLOOP, S.L.; JOHNSON, A.K.; MCCARTY, R.; GRUBER, K.A. Central oxytocin systems may mediate a cardiovascular response to acute stress in rats. *American Journal Physiology*. v. 256, p. H1396-H1377, 1989.

CAO, W.T.; MORRISON, S.F. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*. v. 126, p. 229-240, 2004.

COSTA, M.; BROOKES, S.J. The enteric nervous system. *American Journal Gastroenterology*, v. 89, p. Suppl: S129-S137, 1994.

DAMPNEY, R.A.L. Functional Organization of central pathways regulation the cardiovascular system. *Physiological Review*. v. 74(2), p.323-364, 1994.

DA SILVA JR., L.G.; MENEZES, R.C.A.; SANTOS, R.A.S, CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; FONTES, M.A. Role of the periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Research*, v. 948. p. 206-214, 2003.

DA SILVA JR., L.G.; MENEZES, R.C.A.; VILLELA, D.C.; FONTES, M.A.P Excitatory amino acid receptors in periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuroscience*. v. 139, p. 1129-1139, 2006.

DE NOVELLIS, V.; STOTZ-POTTER, E.H.; MORIN, S.M.; ROSSI, F.; DIMICCO, J.A. Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. *American Journal Physiology*. v. 269, p. R131-R140, 1995.

DEPRÉ, C.; RIDER, M.H.; HUE, L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *European Journal of Biochemistry*. v. 258, p. 277-290, 1998.

DIMICCO, J.A.; SAMUELS, B.C.; ZARETSKAIA, K.D.; SAMPLE, R.H.B.; WIBLE-JR, J.H. The dorsomedial hypothalamus and response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v. 71, p. 469-480, 2002.

DIMICCO, J.A.; STOTZ-POTTER, E.H.; MONROE, A.J.; MORIN, S.M. Role of the dorsomedial hypothalamus in cardiovascular response to stress. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 23, p. 171-176, 1996.

DROZDOWSKI, L.A.; THOMSON, A.B.R.; Intestinal sugar transport. *World Journal of Gastroenterology*. v.12(11), p. 1657-1670, 2006

FATTOR, J.A.; MILLER, B.F.; JACOBS, K.A.; BROOKS, G. A. Catecholamine response is attenuated during moderate-intensity exercise in response to the "lactate clamp." *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)*. v. 288, p. E143–E147, 2005.

FERRER, J.C.; FAVRE, C.; GOMIS R.R.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; GARCIA-ROCHA, M.; IGLESIA, N.; CID, E.; GUINOVAT, J.J. Control of glycogen deposition. *Elsevier Science*. v. 546, p. 127-132, 2003.

FOLKOW, B. Psychosocial and central nervous influences in primary hypertension. *Circular*. v. 76, p. 179-192, 1998.

FONTES, M.A.P.; MENEZES, R.C.A.; VILLELA, D.C.; DA SILVA, L.G.Jr. O hipotálamo dorsomedial e a organização da resposta cardiovascular ao estresse emocional: uma perspectiva funcional. *Medicina, Ribeirão Preto*. v. 39, p. 13-20, 2006.

FONTES, M.A.P.; TAGAWA, T.; POLSON, J.W.; CAVANAGH, S.J.; DAMPNEY, R.A.L. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology*. v. 280, p. H2891-H2901, 2001.

FRIZZELL, R.A.; FIELD, M.; SCHULTZ, S.G. Sodium coupled chloride transport by epithelial tissues. *American Journal Physiology*. v. 236(1), p. F1-F8, 1979.

GERSHON, M.D, KIRCHGESSNER, A.L.; WADE, P.R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd ed. New York: Raven Press, p. 381-422, 1994:

GOYAL, R.K.; HIRANO, I. The enteric nervous system. *New England Journal of Medicine*. v. 334, p.1106-1115, 1996.

GREENWOOD, B.; DIMICCO, J.A. Activation of the hypothalamic dorsomedial nucleus stimulates intestinal motility in rats. *American Physiological Society*. v. 268, p. G514-G521, 1995.

HASSID, W.Z.; ABRAHAM, S. Determination of glycogen with antrone reagent. *Methods Enzymology*. v. 3, p. 35-36, 1957.

HATCH, M.; FREEL, R.W. Increased colonic sodium absorption in rats with chronic renal failure is partially mediated by AT1 receptor agonism. *American Journal of Physiology*. v. 295, p. 348-356, 2008

HELLIWELL, A.P.; RUMSBY, M.G.; KELLETT, G.L. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase c-II mediated by phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. *The Journal of biological Chemistry*. v.278 (31), p. 28644-28650, 2003.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E.; Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neuroscience*, v. 20, p. 78-84, 1997.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E.; ZIEGLER, D.R.; TASKER, J.G. Role of paraventricular nucleus microenvironment in stress regulation. *European Journal of Neuroscience*. v. 16, p. 381-385, 2002.

HOHORST, H. J. D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate determination with glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase. *Methods of Enzymatic Analysis* (H.V. Bergmeyer). *Academy Press, New –York, London*. 134-139, 1973.

HORIUCHI, J.; MCALLEN, R.M.; ALLEN, A.M.; KILLINGER, S.; FONTES, M.A.P.; DAMPNEY R.A.L. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *American Journal Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 287, p. 824-832, 2004.

IONESCU, E.; COIMBRA, C.C.; WALKER, C.D. JEANRENAUD, B.; Paraventricular nucleus modulation of glycemia in freely moving lean rats. *American Journal Physiology (Regulatory, Integrative and Comparative Physiology)*. v. 257, p.1370-1376, 1989.

JONES, M.P.; DILLEY, J.B.; DROSSMAN, D.; CROWELL, M.D.; Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroenterology and Motility*. v.18(2), p. 91-103., 2006.

KALSBECK, A.; LA FLEUR, S.; VAN HEIJNINGEN, C.; BUIJS, R.M.; Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control

plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervations of the liver. *The Journal of neuroscience*. v. 24(35), p. 7604-7613.

KANNAN, H.; HAYASHIBA, Y.; YAMASHITA, H.; Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *American Journal of Physiology (Regulatory, Integrative and Comparative Physiology)*. v. 256, p. 1325-1330, 1989.

KELLETT, G.L.; HELLIWELL, P.A. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochemical Journal*. v.350, p. 155-162, 2000.

KILLIAN, A.J.; SAUNDERS, P.R.; BIJLSMA, P.B.; BERIN, M.C.; TAMINIAU, J.A.N.; GROOT, J.A., PERDUE, M.A. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Gastrointestinal Liver Physiology*. v. 38, p. 1037-1044, 1998.

KRUGER, D.F.; MARTIN, C.L.; SADLER, C.E. New insights into glucose regulation. *The diabetes education*. v. 32(2), p. 221-228, 2006.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, T.; BRZOZOWSKI, T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *Journal of Physiology and Pharmacology*. v.55(1), p. 137-154, 2004.

LAMPRECHT, W.; TRAUTSCHOLD, I. Adenosine 5 triphosphate determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Methods and Enzymatic Analysis* (H.V.Bergmeyer, ed). *Academic Press, New-York & London*, 543-551, 1963.

LIEDTKE, C. M.; HOPFER, U. Mechanism of Cl^- translocation across small intestinal brush-border membrane. I. Absence of Na^+ - Cl^- cotranspor. *American Journal Physiology (Gastrointestinal and Liver Phisyology)*. v. 242, p. G263-241, 1986.

MACHADO, A.D.; HAIBARA, A.S.; PETROIANU, A.; BORGES, E.L. Effects of vasoactive intestinal polypeptide microinjected into the nucleus tractus solitaries on jejunal electrolytes absorption in rats. *Neuropeptides*. v. 39(1), p. 15-19, 2005.

MALLET, R. T.; JACKSON, M. J.; KELLEHER J. K. Jejunal epithelial glucose metabolism: effects of Na^+ replacement. *American Journal Physiology*. v. 251, p. C803-809, 1986.

MARTIN, D.S.; HAYWOOD, J.R. Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculine in conscious rats. *American Journal Physiology*. v. 265, p. H1727-H1733, 1993.

MARTIN, D.S., HAYWOOD, J.R., Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. *Brain Research*. v. 577. p. 261-267, 1992.

MARTIN, D.S.; SEGURA, T.; HAYWOOD, J.R. Cardiovascular responses to bicuculline in rat paraventricular nucleus. *Hypertension* .v. 18, p. 48-55, 1991.

MARTY, N.; DALLAPORTA, M.; THORENS, B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasy. *Physiology*. v.22, p. 241-251, 2007.

MAYER, E.A., The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*. v. 47, p. 861-869, 2000.

MCEWEN, B.S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease . *Archives of Internal Medicine*. v.153, p. 2093-2101, 1993.

MENEZES, R.C.A.; ZARETSKY, D.V.; FONTES, M.A.P, DIMICCO, J.A. Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Research*. v. 1092(1), p. 129-137, 2006.

MICHAL, G.; BEUTLER, H.O. D-fructose 1,6 diphosphate dehydroxyacetone phosphate and glyceraldehydes-3-phosphate. *Methods of Enzymatic Analysis* (H.V.Bergmeyer, ed). *Academic Press*, New-York & London, 2nd, edn 3, 1314-1319, 1974.

MEDDINGS, J.B.; SWAIN, M.G. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology*. v. 119, p. 1019 –1028, 2000.

MONNIKIES, H.; SCHMIDT, B.G.; RAYBOULD, H.E.; TACHÉ, Y.; CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic motor response to restraint stress. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. v.262. p. 137-143, 1992

MORGAN, E.L.; MACE,O.J.; AFFLECK, J.; KELLETT, G.L.; Apical GLUT2 and Cav1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *Journal of Physiology*. v. 580(Pt.2), p. 593-604, 2007.

MORIN, S.M.; STOTZ-POTTER, E.; DIMICCO, J.A.; injection of muscimol in dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v. 280. p. 276-281, 2001.

MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions. *Endocrine Review*. v.5, p. 25-44, 1984.

NORDLIE, R.C.; FOSTER, J.D.; LANGE, A.J. Regulation of glucose production by liver. *Annual Review of Nutrition*. v.19, p. 379-406, 1999.

PAKÁČ, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implication for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*. v. 22(4), p. 502-548, 2001.

PAXINOS G., WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition. Academic Press, New York, 1986.

PEREIRA, F.K.S.; NEVES, M.J.; LIMA, M.P.; BRAGA, A.A.; PESQUERO, J.L. DORETTO, M.C.; BORGES, E.L. Peripheral glucose metabolism is altered by epileptic seizures. *Metabolic Brain Disease*. v. 23, p.105-114, 2008.

PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Reviews of Biochemical*. v. 57, p. 755-783, 1988.

ROACH, J.P. Glycogen and its metabolism. *Current Molecular Medicine*. v. 2, p. 101-120, 2002.

SATISH, S.C.; RENAE, A.; HATFIELD, B.S.; JERRY, M.; MIND, J.; Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility. *The American Journal of Gastroenterology*. v. 93(6). p. 985-990, 1998.

SAUNDERS, U.K.; MACKAY, D.M.; PERDUE, M. H. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *American Journal Physiology*, v. 30, p. G794 – G977, 1994.

SCHLENKER, E.; BARNES, L.; HANSEN, S.; MARTIN, D.; Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. *Brain Research*. v. 23:895. p.33-40, 2001

SILVEIRA, S.A.; LIMA, N.R.V.; HAIBARA, A.S.; COIMBRA, C.C. The hypothalamic paraventricular nucleus and carotid receptors modulate hyperglycemia induced by hemorrhage. *Brain Research*. v. 993, p. 183-191, 2003.

SODERHOLM, J.D.; PERDUE, M.H.; Stress and the gastroinrestinal tract II. Stress and intestinal barrier function. *American Journal Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 280, p. G7-G13, 2001.

SHEPHERD, E.J.; HELLIWELL, P.A.; MACE, O.J.; MORGAN, E.L.; PATEL, N.; KELLET, G.L. Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. *Journal of Physiology*. v. 560, p.281–290, 2004.

STOTZ-POTTER, E.H.; WILLIS, L.R.; DIMICCO, J.A. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *Journal of Neuroscience*. v. 16(3), p. 1173-1179, 1996 a.

STOTZ-POTTER, E.H.; MORIN, S.M.; DIMICCO, J.A. Effect of microinjection of muscimol into dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Research*. v. 42, p. 219-224, 1996 b.

SURWIT, R.S.; SCHNEIDER, M.S.; FEINGLOS, M.N. Stress and diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus*. v. 15, p. 1413-1422, 1992.

TER HORST, G.J.; LUITEN, P.G.M. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in rat. *Brain Research Bulletin*. v. 16(2), p. 231-248, 1986.

THOMPSON, R.H.; CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Organization of projections from dorsomedial nucleus of hypothalamus: A PHA-L study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v.376, p. 143-173, 1996.

TORAASON, M.A.; BADGER, D.W.; WRIGHT, G.L. Gastrointestinal response in rats to vibration and restraint. *Experimental Research*, v. 23, p. 341–347, 1980.

ZAIA, C.T.B.V.; GAZIRI, L.C.J.; ZAIA, D.A.M.; DELATTRE, E.; DOLNIKOFF, M.S.; TIMO-IARIA, C. Effect of chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamic nucleus on blood glucose, triglycerides and free fatty acids in rats. *Brain Research Bulletin*, v. 42, p. 195-198, 1997.

ZAHEDI, A.S.L.; ALIPOUR, M.; The effects of insulin on glucose and fluid transport in the isolated small intestine of normal rats. *Life Sciences*. v. 81(1). p. 26-30., 2007.

ZARDOOZ, H.; ZAHEDI, A.S.; GHARIB, M.K.; HEDAYATI M.; Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiology & behavior*. v. 89(3). P. 373-8, 2006.

ZHANG, X.; FOGEL, R.; Glutamate mediates an excitatory influence of the paraventricular hypothalamic nucleus on dorsal motor nucleus of the vagus. *Journal of Neurophysiology*. v. 88. p. 49-63. 2002.

ZHANG, X.; FOGEL, R.; REHEHAN, W.E.; Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. v. 277, p. 79-90, 1999.

YAMADA, F.; INOUE, S.; SAITOH, T.; TANAKA, K.; Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology*. v. 132. p. 2199-2205., 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)