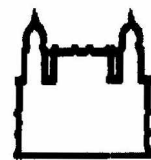




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

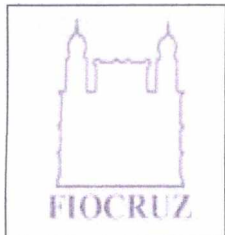
**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES KAPPA-OPÍÓIDES
CENTRAIS NO CONTROLE DA GLICEMIA EM RATOS
SUBMETIDOS A JEJUM E ESTRESSE DE CONTENÇÃO**

DINA BARROS DE SOUZA

SALVADOR - BAHIA - BRASIL

2008





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES KAPPA-OPIÓIDES
CENTRAIS NO CONTROLE DA GLICEMIA EM RATOS
SUBMETIDOS A JEJUM E ESTRESSE DE CONTENÇÃO**

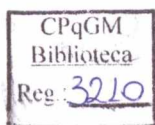
DINA BARROS DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Emílio José de Castro e Silva

SALVADOR – BAHIA – BRASIL

2008



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ
Salvador-Bahia

S719p SOUZA, Dina Barros de
Participação dos receptores Kappa-Opióides centrais no controle da glicemia em ratos submetidos a jejum e estresse de contenção. [manuscrito]. / Dina Barros de Souza. - 2008.
63 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.

Orientador: Prof. Dr.: Emílio José de Castro e Silva, Laboratório de Neurociências.

1. Receptores K-Opióides . 2. Glicemia. I. Título.

CDU 616.8: 612.122

21201

"PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES KAPPA-OPÓIDES CENTRAIS NO CONTROLE DA GLICEMIA EM RATOS SUBMETIDOS A JEJUM E ESTRESSE DE CONTENÇÃO"

DINA BARROS DE SOUZA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Irismar Reis de Oliveira

Professor Titular

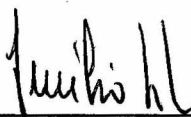
UFBA



Dr. Ailton Souza Melo

Professor Adjunto

UFBA



Dr. Emilio José de Castro e Silva

Professor Titular

UFBA

Dedico este trabalho aos meus pais, a
Fernando Carvalho e a Vanilson Souza.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Emílio de Castro e Silva pelas instruções e idéias necessárias para a realização desse estudo;

A Fernando Carvalho que me apresentou o mundo da pesquisa ainda na faculdade. Pelo incentivo e co-orientação durante o mestrado;

À Professora Josmara Fregonese pela co-orientação durante o mestrado;

Meu muito obrigado a Vanilson Souza por me ensinar todo senso de responsabilidade, compromisso e ética no ambiente de pesquisa;

A José pela paciência, ajuda diária e principalmente por me ensinar tratar os animais com respeito;

Aos meus amigos do laboratório: Lilia, Anderson, Carla, Hilda, Janeide, Rejane, Patrícia, Elenilda e Ana pela ajuda e convivência saudável;

Às estudantes de iniciação científica: Carol, Katharina, Flávia, Isabella e Queilla por todo trabalho do dia-a-dia e apoio nos momentos de sufoco. Principalmente pelos finais de semana sem lazer;

Ao Professor Cândido Coimbra, ao estudante de Doutorado Daniel e técnico André da UFMG pelas orientações prestadas na dosagem da insulina;

Aos meus três grandes pilares: Sonia, Samuel e Aline por todo amor, apoio e compreensão;

Meu companheiro Tiago pelas provas diárias de amor, paciência e compreensão;

Todos os meus tios e primos pelo carinho e torcida;

À minha irmã de coração Fernanda Barretto pelos mais de 10 anos de companheirismo, amor, torcida e carinho;

Aos Cambeses, minha nova família, pelo apoio nos momentos difíceis;

Às amigas da faculdade de enfermagem: Gisele, Naiane, Sheila, Gabriela, Flávia, Joane, Samara, Érika, Paula e Carla pelos conselhos, estudos coletivos e pela torcida.

Aos meus amigos: Tia Urânia, Serginho, Gordinho, Aninha, Joana Lima por todos os anos de convivência;

Aos meus colegas do Hospital: Denice, Laila, Benedito, Elba, Margarete, Lívia, Mayana, Renata, Cíntia, Luciana, Graça, Patrícia, Luciana Paiva, Mariana, Adriana, Rose, Thais pelas trocas, substituições e folgas necessárias para realização deste trabalho;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: efeitos das injeções, no terceiro ventrículo cerebral, de ICI 199.441, em diferentes doses, ou salina sobre os níveis glicêmicos de ratos Wistar machos em jejum. p.38

FIGURA 2: efeito do pré-tratamento central com a nor-binaltorfimina, em diferentes doses, ou salina na hiperglicemia obtida pela administração do ICI 199.441 na dose de 4,68 nmol. p.40

FIGURA 3: efeitos das administrações no terceiro ventrículo cerebral de nor-binaltorfimina, em diferentes doses, ou salina sobre os níveis plasmáticos glicêmicos de ratos Wistar machos em jejum. p.42

FIGURA 4: efeitos das injeções, no terceiro ventrículo cerebral, da nor-binaltorfimina, em diferentes doses, ou salina sobre a hiperglicemia induzida pelo estresse de contenção em ratos Wistar machos em jejum. p.44

FIGURA 5: efeito da injeção no terceiro ventrículo cerebral de ICI 199.441, na dose de 4,48 nmol, ou salina sobre os níveis plasmáticos de insulina de ratos Wistar machos em jejum. p.46

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH – hormônio adenocorticotrófico;
- AMPC – adenosina monofosfato cíclico;
- CRH – hormônio estimulador de corticotropina;
- DAGO – (Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol);
- DALA – D-ala²-met-encefalinamida;
- DNA – Ácido Desoxinucleico;
- EM-1 – endomorfina 1;
- EM-2 – endomorfina 2;
- HL – hipotálamo lateral;
- HVM – hipotálamo ventromedial;
- Leu-encefalina – leucina-encefalina;
- LH – hormônio luteinizante;
- Met-encefalina – metionina-encefalina;
- MSH – hormônio estimulador de melanócitos;
- N/OFQ - nociceptina/orfanina;
- NOP – receptor para nociceptina/orfanina;
- nor-BNI – nor-binaltorfimina;
- ORL-1 – *opioid receptor like-1*;
- PDIN – prodinorfina;
- PENC – proencefalina;
- POMC – proopiomelanocortina;
- PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo;
- mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro;

SNA – sistema nervoso autônomo;

SNC – sistema nervoso central;

RESUMO

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES KAPPA-OPÍOÍDES CENTRAIS NO CONTROLE DA GLICEMIA EM RATOS SUBMETIDOS A JEJUM E ESTRESSE DE CONTENÇÃO.

Dina Barros de Souza

Orientador: Emílio José de Castro e Silva

O sistema opiatérgico central participa, assim como outros sistemas neuronais, no controle da glicemia. O presente trabalho foi desenvolvido para investigar a participação do receptor opiatérgico central do tipo kappa na glicorregulação de ratos submetidos a jejum. Foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250g) submetidos a cirurgia de estereotaxia com canulação do terceiro ventrículo cerebral. Um dia antes da sessão experimental, os animais foram submetidos à cateterização da veia jugular externa direita para coletas sanguíneas seriadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. As amostras sanguíneas, após centrifugação, foram utilizadas para dosagem da glicemia e da insulina. Depois da coleta basal (tempo 0), foram administradas por via intracerebroventricular as drogas ICI 199.441 (agonista seletivo dos receptores kappa-opioides) e nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores kappa-opioides). Injeção do ICI 199.441 promoveu aumento significativo nos níveis glicêmicos dos ratos submetidos a 18 horas de jejum, quando comparado com as concentrações plasmáticas de glicose de animais controles que receberam salina isotônica. O pré-tratamento com o nor-BNI reverteu o resultado obtido pela administração do agonista kappa-opioides. A administração da nor-binaltorfimina isoladamente não promoveu alterações significativas na glicemia dos ratos. O nor-BNI também não foi capaz de diminuir a hiperglicemia induzida pelo estresse de contenção. As concentrações plasmáticas de insulina dos ratos que receberam ICI 199.441 não sofreram mudanças significativas quando comparado com os níveis plasmático de insulina de animais controles. Diante destes resultados, sugere-se que os receptores kappa-opioides centrais ativa mecanismos que levam ao aumento nas concentrações plasmáticas de glicose em animais submetidos a jejum. Além disso, o componente kappa-opioides central parece não ser importante na resposta hiperglicêmica induzida pelo estresse de contenção.

PALAVRAS CHAVES: receptores kappa-opioides, glicemia, estresse

ABSTRACT

PARTICIPATION OF BRAIN KAPPA-OPIOID RECEPTORS IN THE CONTROL OF BLOOD GLUCOSE CONCENTRATION IN FASTED RATS SUBMITTED OR NOT TO RESTRAINT STRESS.

Dina Barros de Souza

Orientation by Emílio José de Castro e Silva

The brain opiate system may play a fundamental role in the control of glucose homeostasis. In the present paper, we investigated the role of brain kappa-opioid receptors in the control of blood glucose levels in fasted rats. Wistar male rats (200-250 g) underwent stereotaxic cannulation of the third ventricle. To allow blood sampling, the animals had a jugular catheter implanted the day before the experimental sessions. Plasma samples were collected for measurement of glucose and insulin concentrations. Opioid drugs (ICI 199.441, selective kappa-opioid agonist and nor-binaltorphimine, specific kappa-opioid antagonist) were injected into the third ventricle. The central administration of ICI 199.441 induced a significant increase in plasma glucose levels in rats submitted to fast for 18-hours, as compared to a drug-free control group. Pretreatment with nor-binaltorphimine reverted the hyperglycemic effect observed after the kappa-opioid agonist administration, while the central injection of the kappa-opioid antagonist alone was devoid of effect. Also, the central administration of the kappa-opioid antagonist was unable to change the hyperglycemic response to restraint stress. Furthermore, plasma insulin levels were not modified by the central injections of ICI 199.441. It is suggested that central kappa-opioid receptors activate mechanisms triggering the increase in blood glucose levels in fasted rats, and that the hyperglycemic response to restraint stress in these animals seems to rely on mechanisms that are not related to central kappa-opioid components.

KEYWORDS: kappa-opioid receptors, glucose, stress

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p.13
1.1 SISTEMA OPIATÉRGICO	p.13
1.2 DISTRIBUIÇÃO DOS PEPTÍDEOS E RECEPTORES OPIATÉRGICOS NO SNC	p.16
1.3 DISTRIBUIÇÃO DOS PEPTÍDEOS E RECEPTORES OPIATÉRGICOS EM SÍTIOS PERIFÉRICOS RELACIONADOS COM A GLICORREGULAÇÃO	p.19
1.4 SISTEMA OPIATÉRGICO E SUAS PRINCIPAIS FUNÇÕES	p.21
1.5 SISTEMA OPIATÉRGICO E A REGULAÇÃO GLICÊMICA	p.24
2 OBJETIVOS	p.28
2.1 OBJETIVO GERAL	p.28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	p.28
3. JUSTIFICATIVA	p.29
4 METODOLOGIA	p.30
4.1 ANIMAIS	p.30
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	p.30
4.3 DROGAS E MICROINJEÇÕES	p.31
4.4 COLETAS SANGUÍNEAS	p.32
4.5 ESTRESSE DE CONTENÇÃO	p.32
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	p.33
4.7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	p.33
4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	p.34
5 RESULTADOS	p.37
5.1 GRUPO EXPERIMENTAL I	p.37
5.2 GRUPO EXPERIMENTAL II	p.39

5.3 GRUPO EXPERIMENTAL III	p.41
5.4 GRUPO EXPERIMENTAL IV	p.43
5.5 GRUPO EXPERIMENTAL V	p.45
6 DISCUSSÃO	p.47
7 CONCLUSÕES	p.56
8 REFERÊNCIAS	p.57

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA OPIATÉRGICO

Os peptídeos opióides endógenos são classificados em três famílias distintas, sendo cada uma destas derivadas de moléculas precursoras geneticamente diferentes. São elas proopiomelanocortina (POMC), proteína precursora da beta-endorfina, proencefalina (PENC), precursora na síntese das encefalinas e prodinorfina (PDIN), precursora da dinorfina. O processamento das moléculas precursoras não se dá de modo igual em todos os tecidos. Assim, uma mesma molécula precursora pode originar diferentes peptídeos, a depender da sua localização tecidual (JORDAN e DEVI, 1998).

A POMC contém uma seqüência de aminoácidos Met-encefalina que codifica tanto peptídeos opióides quanto não opióides. Entre estes encontram-se o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o hormônio estimulante de melanócitos (MSH) (NAKANISHI et al., 1979, SCHOLZEN et al., 2000). A PENC contém no mínimo quatro cópias de Met-encefalina e uma de Leu-encefalina, flanqueadas por pares de aminoácidos básicos. Na porção C-terminal deste precursor pode ser observado um heptapeptídeo Met-encefalina-Arg6-Gly7-Leu8, também flanqueado por aminoácidos comuns (NODA et al., 1982). A PDIN é constituída por três cópias de Leu-encefalina. O processamento seletivo de resíduos dos aminoácidos básicos gera a formação inicial dos peptídeos alfa e beta-neoendorfinas e da dinorfina A (1-17). Na fase subsequente do processamento seletivo, a dinorfina A dá lugar a dinorfina A (1-8) e a formação da dinorfina B (1-13) (KAKIDANI et al., 1982).

Acredita-se que as encefalinas ligam-se, seletivamente, aos receptores delta-opiídeos (δ), a beta-endorfina tem seletividade pelos receptores opiatérgicos do tipo mu (μ), enquanto que a dinorfina possui seletividade pelos receptores kappa-opiídeos (κ) (PIESTRZENIEWIEZ et al., 2006).

As endomorfina são estruturalmente diferentes dos peptídeos opióides endógenos, sendo caracterizadas como tetrapeptídeos endógenos seletivos

para os receptores opiatérgicos do tipo μ (ZADINA et al., 1997). Estudos anteriores, em camundongos, demonstraram que a administração intracerebroventricular de EM-1 e EM-2 produziu potente analgesia, bloqueada pelo pré-tratamento com antagonistas μ -opióide seletivos, conhecidos como naloxonazina ou beta-funaltrexamina (GOLDBERG et al., 1998).

Os estudos realizados por diversos pesquisadores permitiram a identificação dos receptores opiatérgicos mu (μ), kappa (κ) e delta (δ) (JAMES e GOLDSTEIN, 1984, GILLAN e KOSTERLITZ, 1982). O emprego de agonistas e antagonistas seletivos permitiu conhecer as características, a distribuição e os ligantes endógenos de cada um desses receptores. Recentemente foi isolado um novo receptor opiatérgico conhecido como NOP (receptor para nociceptina/orfanina), cujo ligante endógeno denomina-se nociceptina/orfanina (N/OFQ) (PELUSO et al., 1998, COX et al., 2000).

Estudos farmacológicos e bioquímicos concluíram que esses receptores ainda se dividem em subtipos como, por exemplo, os receptores kappa (κ_1 ; κ_2 ; κ_3), delta (δ_1 e δ_2) e mu (μ_1 ; μ_2 ; μ_3). Até o momento, sabe-se que os receptores opiatérgicos dos ratos são semelhantes aos receptores encontrados em humanos, tanto na estrutura como nas repostas farmacológicas (GAVÉRIAUX-RUFF et al., 1997).

A biologia molecular demonstrou que os receptores opiatérgicos mu, kappa e delta são receptores de membrana acoplados à proteína G. Eles apresentam uma estrutura molecular com sete domínios hidrofóbicos em alfa-hélice que atravessam a membrana celular, chamados de domínios transmembranas. Esses domínios são interconectados por meio de seis alças, sendo três delas expostas ao espaço extracelular e as outras três no citoplasma. A porção N-terminal dos receptores opiatérgicos encontra-se exposta no meio extracelular, enquanto que a porção C-terminal se localiza no citoplasma da célula (KIEFFER et al., 1992; LI et al., 1993).

Estudos demonstraram que a terceira alça extracelular dos receptores delta-opioides, a primeira e terceira alças extracelulares dos receptores

opiatérgicos do tipo μ , bem como a segunda alça extracelular e o quarto domínio transmembranar dos receptores opióides kappa são locais importantes envolvidos na ligação de agonistas seletivos a tais receptores (WANG et al., 1995; XUE et al., 1994).

Como dito anteriormente, os receptores opiatérgicos se encontram acoplados à proteína G, que é capaz de estimular ou inibir proteínas celulares com atividade enzimática que catalizam a síntese de segundos mensageiros. A interação do complexo receptor-ligante com a proteína G produz sinais de transdução que ativam ou inibem sistemas efetores. A existência de múltiplos efetores e as diversas respostas biológicas mediadas pelos opióides torna evidente a necessidade de múltiplos mecanismos de sinalização. No caso dos receptores opiatérgicos, o sistema efector pode ser: adenilato ciclase (SHARMA et al., 1977), canais de cálcio (PIROS et al., 1996), fosfolipase C (JOHNSON et al., 1994), canais de potássio (HENRY et al., 1995) e proteinoquinasas (LI e CHANG, 1996). O sistema efector, tanto ativado quanto inibido, promove mudanças nos níveis intracelulares de segundos mensageiros (AMP cíclico, inositol trifosfato e diacilglicerol, por exemplo) que alteram a fosforilação de proteínas dentro da célula. Tais proteínas se unem às seqüências específicas de regiões promotoras de determinados genes da molécula de DNA, gerando efeitos fisiológicos e patológicos diversos.

1.2 DISTRIBUIÇÃO DOS PEPTÍDEOS E RECEPTORES OPIATÉRGICOS NO SNC

Estudos neuroanatômicos, utilizando técnicas da imuno-histoquímica e da auto-radiografia, têm auxiliado na localização dos receptores opiatérgicos no sistema nervoso central. As limitações para a descrição anatômica desses receptores têm sido superadas com a utilização das técnicas de hibridização *in situ* e de imuno-histoquímica que permitem identificar a localização do mRNA das células que sintetizam o receptor opiatérgico estudado (MANSOUR et al., 1995). Conhecer a distribuição dos receptores opiatérgicos é de suma importância, pois permite identificar as possíveis modulações que o sistema opiatérgico exerce sobre outros sistemas neuronais como o dopaminérgico, o colinérgico e o serotoninérgico. A descrição da localização dos receptores opióides também possibilita sugerir como o sistema opiatérgico modula diversas funções fisiológicas do organismo.

A distribuição dos distintos peptídeos opióides endógenos no sistema nervoso central é muito ampla, existindo diferenças quanto a localização de cada um destes peptídeos. Assim, os grupos celulares que contêm POMC estão localizados no hipotálamo medial basal, principalmente no núcleo arqueado (BLOOM et al., 1978). Estas áreas cerebrais projetam axônios tanto para regiões periventriculares, como o núcleo paraventricular, quanto para diferentes estruturas do sistema límbico, *locus coeruleus*, núcleo parabraquial e ambíguo, núcleo do trato solitário e dorso-motor do vago (JOSEPH et al, 1983). Nos lóbulos anterior e médio da hipófise é encontrado grande número de neurônios que expressam beta-endorfina (ZAKARIAN e SMYTH, 1982). É deste modo que, a depender do tipo de célula e da especialização do tecido, ocorrerão diversos processamentos da POMC, resultando no ACTH, β -endorfina e melanocortinas.

Os neurônios que contêm os peptídeos derivados da PENC estão distribuídos amplamente pelo sistema nervoso central, desde a região cortical que possui grande quantidade de neurônios e fibras nervosas, até a medula

espinhal. O hipotálamo contém grande número de neurônios que expressam a PENC, particularmente os núcleos arqueado e paraventricular (PEGO-REIGOSA et al., 2000). Essa extensa distribuição sugere que este sistema participe de funções tanto sensoriais e motoras quanto neuroendócrinas.

Alta imunorreatividade para a PDIN foi observada em núcleos hipotalâmicos como os núcleos anterior e dorsomedial, núcleos arqueado e paraventricular, núcleo supraóptico e na eminência média. Concentrações elevadas de PDIN foram também detectadas na área perifornical, núcleos supraquiasmático e ventromedial, e na área preóptica lateral e medial (ZAMIR et al., 1983). Núcleos do tronco cerebral e medula espinhal são outros exemplos de áreas do sistema nervoso central em que foram encontrados neurônios que contêm a PDIN (BOTTICELLI et al., 1981). A PDIN assim como a PENC, também foi detectada em lóbulos da hipófise, especialmente no lóbulo neural da pituitária (BOTTICELLI et al., 1981).

Como dito anteriormente, as endomorfina do tipo EM-1 e EM-2 são opióides endógenos com alta afinidade pelos receptores do tipo mu (ZADINA et al., 1997). Essas endomorfina estão localizadas em diversas áreas do cérebro, incluindo o hipotálamo, tálamo, córtex e estriado (SCHREFF et al., 1998). Mais recentemente as endomorfina do tipo EM-1 e EM-2 também foram detectadas no sistema imunológico de ratos (JESSOP et al., 2000).

Trabalhos têm demonstrado a existência de altas concentrações de receptores μ -opióides na região do tálamo, núcleo estriado, núcleo accumbens, locus coeruleus e núcleo de trato solitário (MANSOUR et al., 1995, CROSS et al., 1987). Receptores do tipo delta-opióide já foram localizados em regiões cerebrais como: neocórtex, núcleo accumbens e núcleo estriado reticular lateral e amígdala (MANSOUR et al., 1995). Receptores opiatérgicos do tipo kappa foram encontrados no hipotálamo dorsomedial e ventromedial, núcleo accumbens, área preóptica medial, núcleo paraventricular e supraóptico, núcleo parabraquial, *locus coeruleus*, núcleo do trato solitário (MANSOUR et al., 1995, KITCHEN et al., 1997). Recentemente, demonstrou-se que receptores kappa-opióides imunoreativos estão presentes em neurônios pré- e

pós-sinápticos localizados no bulbo ventromedial rostral em ratos de ambos os sexos (DRAKE et al., 2007). Por último, os receptores do tipo ORL1 estão distribuídos de modo difuso no sistema nervoso central e na medula espinhal (PELUSO et al., 1998).

Os diversos subtipos de receptores opiatérgicos não estão localizados em uma mesma região do sistema nervoso central e, sim, distribuídos de maneira difusa em regiões distintas, podendo haver áreas onde subtipos diferentes co-existam. Por exemplo, os receptores k_1 -opiídeos foram encontrados no núcleo dorsal da rafe, substância nigra, hipotálamo, amígdala e córtex. No entanto, os receptores k_2 -opiídeos estão distribuídos na região do tálamo, hipotálamo, hipocampo, córtex e medula espinhal (ZUKIN et al., 1988). Já os receptores k_3 -opiídeos estão altamente presentes no hipotálamo, tálamo, estriado e de forma moderada no córtex e medula espinhal (CHENG et al., 1992).

1.3 DISTRIBUIÇÃO DOS PEPTÍDEOS E RECEPTORES OPIATÉRGICOS EM SÍTIOS PERIFÉRICOS RELACIONADOS COM A GLICORREGULAÇÃO

Os peptídeos opióides endógenos já foram localizados no pâncreas de diversas espécies animais. Em 1982, o trabalho realizado por Feurle e colaboradores revelou imunorreatividade no tecido pancreático humano para a [Met⁵]encefalina e [Leu⁵]encefalina. Tais resultados também foram observados em estudos com porcos da índia (STERN et al., 1982). A presença de imunoreatividade para β -endorfina foi descrita em extratos celulares do pâncreas de ratos (SMYTH e ZAKARIAN, 1982) e porcos (HOUCK et al., 1981). Além da região cerebral do hipotálamo, a proopiomelanocortina tem sido encontrada em diversos tipos de tecidos, inclusive no pâncreas endócrino (KNUDTZON, 1986). A presença dos peptídeos opióides endógenos no pâncreas sugere que o sistema opiatérgico exerce controle sobre glicorregulação, através da liberação dos hormônios insulina e glucagon.

Periféricamente, os peptídeos opióides endógenos também estão presentes no tecido hepático. A presença da β -endorfina em hepatócitos de ratos alimentados já foi detectada (MATSUMURA et al., 1984). Além da β -endorfina, a [Met⁵]encefalina e [Leu⁵]encefalina, dinorfina A (1-13) foram encontradas em estudos *in vitro* com hepatócitos (ALLAN et al., 1983, LEACH E TITHERADGE, 1986). Esses opióides endógenos são responsáveis por regular a produção de glicose hepática, através da estimulação da glicogenólise e da gliconeogênese.

A glândula supra-renal é um tecido periférico amplamente conhecido por conter beta-endorfina em diversas espécies animais. Em ratos tornados diabéticos pelo uso da estreptozotocina, o nível de expressão de mRNA da proopiomelanocortina na glândula adrenal é marcadamente maior do que em ratos normais não diabéticos. Tal expressão de mRNA da proopiomelanocortina na glândula adrenal de ratos diabéticos é atenuada pela

administração de insulina exógena, após quatro dias de tratamento (HSU et al., 2002).

1.4 SISTEMA OPIATÉRGICO E SUAS PRINCIPAIS FUNÇÕES

Devido a sua ampla distribuição no sistema nervoso central, o sistema opiatérgico desempenha papel importante no controle da dor e analgesia, estresse, tolerância e dependência, aprendizado e memória, ingestão alimentar e hídrica, alcoolismo e uso abusivo de drogas, atividade sexual e controle hormonal, gravidez, doenças mentais, transtornos neurológicos e do humor, funções hepáticas, gastrointestinais e renais, respostas cardíacas e respiratórias, termorregulação e respostas imunológicas (VACCARINO e KASTIN, 2001).

Ou seja, o sistema opiatérgico atua no controle de diversos parâmetros fisiológicos e comportamentais. O estresse, por exemplo, induz ativação do sistema opióide endógeno (VACCARINO e KASTIN, 2001). Administração crônica de opióides produz profundas alterações nos receptores opiatérgicos, incluindo mudanças nos mecanismos de transdução de sinais e ativação de mecanismos de controle (internalização, dessensibilização, *up-regulation* e *down-regulation*). Tais modificações indicam a participação do sistema opiatérgico na indução de tolerância e dependência (LEE e YOBURN, 2000, VACCARINO e KASTIN, 2001).

Em geral, os agonistas opiatérgicos também produzem aumento na ingestão alimentar e no consumo hídrico (KELLEY et al., 2000). Acredita-se que os receptores μ e delta-opiídeos estão envolvidos ativamente no consumo de álcool, já que injeções de naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opiatérgicos), CTOP (antagonista seletivo dos recptores μ -opiídeos) e naltrindole (antagonista seletivo dos receptores opiatérgicos do tipo delta) reduzem esse efeito (HYYTIA e KIIANMAA, 2000).

Existem evidências que os opiídeos endógenos estão envolvidos no comportamento sexual e reprodutivo. Em macacos, o antagonista opiatérgico nalmefene aumenta as concentrações do hormônio lutenizante (LH) seguido da elevação dos níveis de testosterona (MELLO et al., 2000). Na gravidez e no

período pós-parto, administrações de naloxona não alteram a secreção de prolactina, enquanto que nas fêmeas tratadas com salina ocorre aumento nos níveis de prolactina (GILBERT et al., 2000).

O sistema opiatérgico também atua nas funções gastrointestinais, renais e cardiovasculares. A morfina e outros agonistas opióides inibem as funções gastrointestinais, sendo que tais efeitos são revertidos pelos antagonistas opiatérgicos (YUAN et al., 2000). U69593, agonista dos receptores kappa-opiíides, aumenta a diurese em ratos, enquanto que o antagonista nor-binaltorfimina bloqueia esse efeito (CRAFT et al., 2000). Tratamento crônico com a nor-binaltorfimina eleva ainda mais a pressão arterial média e a frequência cardíaca de ratos que são hipertensos espontaneamente, no entanto esse efeito hipertensivo não foi visto em animais normotensos (SHEN e INGENITO, 2000).

Os receptores opiatérgicos foram encontrados no sistema imunológico, e desta forma modulam a proliferação das células imunológicas. Diversas ações imunomoduladoras do sistema opiatérgico já foram descritas tais como quimiotaxia, produção de superóxidos e citocinas (VACCARINO e KASTIN, 2001).

Os opióides também exercem papel modulador sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estimulando a secreção de adrenocorticotropina (ACTH) pelo lóbulo anterior da hipófise. Cabe destacar que níveis elevados de ACTH na circulação sanguínea estimulam a produção e liberação de glicocorticóides pela glândula adrenal. Altas concentrações de glicocorticóides na circulação exercem *feedback* negativo na hipófise e em outras áreas do sistema nervoso central responsáveis por regular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HARBUZ et al., 1997, ADAM e EPEL, 2007).

Apesar de participar da regulação de diversos parâmetros fisiológicos e comportamentais, o papel do sistema opiatérgico central bem como dos seus receptores específicos na glicorregulação ainda é obscura. Mais especificamente, a participação do receptor opiatérgico do tipo kappa na

glicorregulação é pouco descrita na literatura. Desta forma, a atuação dos receptores kappa-opioides central no controle glicêmico tornou-se o foco deste estudo.

1.5 SISTEMA OPIATÉRGICO E A REGULAÇÃO GLICÊMICA

É bem estabelecido que a estimulação do sistema opiatérgico produz hiperglicemia em diversas espécies *in vivo*. Deste modo, tal sistema atua na regulação da homeostase da glicemia. Diversos estudos já demonstraram que a administração central de morfina produz hiperglicemia. Em 1962, Borison e colaboradores descobriram que injeções de morfina nos ventrículos cerebrais de gatos não anestesiados produzem efeitos hiperglicêmicos.

Dez anos mais tarde, Feldberg e Shaligram (1972) observaram que a hiperglicemia também é obtida com a infusão de morfina no terceiro ventrículo cerebral nesta mesma espécie animal. No trabalho de 1974, Feldberg e Gupta investigaram quais as regiões cerebrais envolvidas na hiperglicemia induzida pela morfina. Os resultados mostraram que a injeção de morfina no aqueduto e no quarto ventrículo cerebral, em gatos não anestesiados, produz aumento significativo nos níveis glicêmicos. Tal efeito hiperglicemiante é também obtido com a administração de morfina no espaço subaracnóide. No entanto, somente com administrações de altas doses de morfina na cisterna magna foi possível observar a hiperglicemia induzida por essa droga.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Dey et al., em 1975, compararam os efeitos da administração central de epinefrina e morfina em gatos submetidos ou não a anestesia. Nesse trabalho, eles puderam observar que a administração intracerebroventricular tanto de adrenalina quanto de morfina produz hiperglicemia. Tais resultados permitiram sugerir que o efeito hiperglicemiante obtido pela estimulação do sistema opiatérgico pode ser dependente da ativação do sistema nervoso simpático.

A administração intracisternal de um potente análogo da met-enkefalina conhecido como DALA (D-ala2-met-enkefalinamida) em ratos machos adultos aumenta as concentrações plasmáticas de epinefrina e norepinefrina (VAN LOON e APPEL, 1981). A injeção de beta-endorfina pela mesma via de administração produziu resposta muito maior do que aquelas observadas com

a infusão de DALA, para as catecolaminas estudadas. A beta-endorfina também eleva os níveis plasmáticos de dopamina (VAN LOON et al., 1981). O pré-tratamento com o bloqueador ganglionar clorisondamina inibiu o aumento das três catecolaminas induzido pela injeção intracisternal de beta-endorfina. A administração sistêmica da guanetidina bloqueia a resposta plasmática da norepinefrina à injeção intracerebral da beta-endorfina (APPEL et al., 1987).

A denervação bilateral da glândula adrenal bloqueou completamente a resposta da epinefrina à beta-endorfina. Essa denervação adrenal também inibiu a hiperglicemia induzida pela beta-endorfina (VAN LOON e APPEL, 1981). O efeito hiperglicêmico da injeção intracerebral de beta-endorfina foi igualmente bloqueado pela administração de somatostatina (VAN LOON et al., 1981). Esses dados são consistentes com a hipótese que os opióides aumentam a atividade simpática central e periférica.

Além da estimulação e liberação das catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), a hiperglicemia induzida pela ativação do sistema opiatérgico parece ser também dependente do aumento da produção de glicose hepática, secundária à estimulação da quebra do glicogênio e da gliconeogênese e da alteração na secreção endócrina do pâncreas.

A administração endovenosa de morfina produz hiperglicemia e eleva os níveis plasmáticos de glucagon e insulina (JOHANSEN et al., 1992). A injeção de beta-endorfina, pela mesma via de administração, também produz aumento significativo nas concentrações de glicose, glucagon e em menor extensão a insulina (REID e YEN, 1981). Tais resultados sugerem que os opióides exercem papel regulador sobre as células alfa e beta pancreáticas, interferindo na produção hepática de glicose.

Radosevich e colaboradores, em 1984, demonstraram que a administração periférica de morfina produziu hiperglicemia em cães alimentados e não anestesiados. Além desse efeito hiperglicêmico, a morfina promoveu aumento na produção de glicose e diminuição no *clearance* desta substância, sem alterar a sua utilização. Estes mesmos autores também

observaram que injeções de morfina foram capazes de aumentar, de modo significativo, os níveis de epinefrina e norepinefrina, bem como os níveis de corticosterona. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que a administração deste opiáceo também elevou os níveis plasmáticos de glucagon.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o tratamento com morfina, em ratos, produz aumento na síntese de glicose em preparações de tecido hepático, como resultado da indução de enzimas gliconeogênicas e a supressão de piruvato quinase (WONG e YEUNG, 1981). Allan e colaboradores, em 1983, observaram que peptídeos opióides endógenos como a Leu-encefalina e a dinorfina (1-13) adicionados a hepatócitos de ratos machos e alimentados estimulam a conversão de [2-¹⁴C]piruvato em glicose. Tais peptídeos também produziram aumento da taxa de glicogenólise, de modo dose-dependente. Resultados semelhantes foram obtidos com a adição de glucagon e epinefrina aos hepatócitos.

A [Leu]encefalina em hepatócitos de ratos alimentados estimula a quebra de glicogênio, através do aumento da atividade da fosforilase alfa. Cabe ressaltar que esse efeito na atividade da fosforilase é um mecanismo cálcio dependente. Ou seja, na presença de cálcio a [Leu]encefalina, assim como a dinorfina (1-13), elevam significativamente a atividade da fosforilase, enquanto que na ausência de cálcio ocorre um efeito contrário ao descrito (LEACH e TITHERADGE, 1986).

Além disso, a infusão de [Leu]encefalina em preparação de hepatócitos de ratos machos alimentados produz redução significativa na produção de lactato, quando comparada com as incubações de tecido hepático oriundo de animais controle, que receberam salina. A adição de glucagon também induz a utilização de lactato pelas células hepáticas. Deste modo, os pesquisadores sugeriram que a [Leu]encefalina atua de maneira análoga à do glucagon, participando do metabolismo hepático de carboidratos, através da estimulação da glicogenólise e gliconeogênese (LEACH et al., 1985). Todos estes estudos levam a crer que os opióides podem agir diretamente no fígado para estimular a síntese de glicose.

Clinicamente, o tramadol é um potente analgésico utilizado amplamente no tratamento da dor intensa. Tal opióide é caracterizado por estimular os receptores opatérgicos, especialmente os receptores do tipo mu. A administração intravenosa de tramadol em ratos diabéticos, induzidos pelo uso da estreptozotocina, reduziu de modo significativo a glicose plasmática, sem alterar o comportamento alimentar e o peso corpóreo dos mesmos. Tal efeito hipoglicemiante do tramadol foi bloqueado pela injeção de naloxona e naloxonazina (antagonista seletivo dos receptores mu-opiíides) de maneira dose-dependente. Além disso, tramadol promoveu aumento da absorção de glicose pelo músculo soleus e da síntese de glicogênio hepático, de modo dose-dependente (CHENG et al., 2001). Administração intravenosa de loperamida, um outro agonista dos receptores mu-opiíides, também reduz de modo significativo a glicemia plasmática de ratos diabéticos (LIU et al., 1999).

Como descrito anteriormente, os opiíides também desempenham um importante papel no controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Diversos estudos já demonstraram que a administração de morfina, inclusive por via intracerebroventricular, produz aumento significativo nos níveis de ACTH, corticosterona e beta-endorfina. Cabe ressaltar que concentrações elevadas de ACTH estimulam a glândula supra-renal produzir e liberar glicocorticóides na circulação sanguínea, elevando os níveis de glicose plasmática (HARBUSZ et al., 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação dos receptores opiatérgicos centrais do tipo kappa na regulação da glicemia de ratos em jejum e submetidos ou não ao estresse de contenção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da ativação farmacológica seletiva dos receptores kappa-opiíides centrais sobre os níveis de glicose plasmática de ratos submetidos a jejum;
- Observar o efeito do bloqueio farmacológico seletivo dos receptores kappa-opiíides centrais sobre os níveis glicêmicos de ratos submetidos a jejum;
- Observar o efeito do bloqueio farmacológico seletivo dos receptores kappa-opiíides centrais sobre a hiperglicemia induzida por estresse de contenção em ratos submetidos a jejum
- Investigar o efeito da ativação farmacológica seletiva dos receptores kappa-opiíides centrais sobre os níveis de insulina plasmática em ratos submetidos a jejum;

3 JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta dos receptores opiatérgicos e das endorfinas, os efeitos dos opióides endógenos e das drogas opiatérgicas no metabolismo da glicose têm recebido muita atenção. Os opióides podem agir tanto na modulação fisiológica quanto farmacológica da glicorregulação. No entanto, os mecanismos e a importância dessas modulações ainda não estão bem estabelecidos na literatura. Deste modo, investigar de que maneira o sistema opiatérgico central, bem como seus receptores específicos, atuam no controle da glicemia é de suma importância para a ampliação dos conhecimentos fisiológicos e neurofarmacológicos.

A literatura tem demonstrado a participação dos receptores centrais opiatérgicos do tipo mu na regulação da glicemia de ratos. Porém, os dados com os receptores kappa-opioides ainda são muito incipientes e requerem maiores investigações. Como citado anteriormente, os receptores opiatérgicos dos ratos são aparentemente idênticos aos humanos, tanto na estrutura molecular como nas repostas farmacológicas e fisiológicas. Desta maneira, a realização de estudos que visem investigar a participação dos receptores kappa-opioides é de grande utilidade nas áreas de clínica médica, metabologia e diabetologia.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

No presente estudo, utilizamos ratos machos da cepa Wistar, pesando em torno de 200 a 250 gramas, oriundos do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Tais animais foram mantidos em caixas individuais em sala com temperatura (22-24°C) e luz controladas, com ciclo claro/escuro que se iniciava às 07h00min e 19h00min respectivamente, com livre acesso a água e ração (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, Brasil) até o dia da sessão experimental. Os protocolos experimentais seguiram as normas estabelecidas pelo National Institute of Health (USA).

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os ratos foram submetidos à canulação do terceiro ventrículo cerebral, após a anestesia geral com pentobarbital sódico (50mg/Kg), por via intraperitoneal. Nesse procedimento cirúrgico, utilizaram-se cânulas especiais confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com diâmetro de 0,7 mm e comprimento padronizado de 15 mm. No intuito de prevenir possíveis obstruções, as cânulas foram ocluídas com mandris removíveis feitos a partir de fios de aço inoxidável (Dentaurum). No procedimento estereotáxico de canulação do terceiro ventrículo, as seguintes coordenadas foram adotadas: antero-posterior 0,5 mm posterior ao bregma, lateral 0,0 mm e vertical 8,5 mm abaixo da calota craniana.

As cânulas foram fixadas ao crânio através da utilização de acrílico dentário autopolimerizante. Após canulação estereotáxica, todos os ratos receberam antibiótico veterinário profilático (Pentabiótico: benzilpenicilina benzatina; benzilpenicilina procaína; benzilpenicilina potássica;

diidroestreptomicina base; estreptomicina base) na dose de 0,2 mL por via intramuscular.

Um dia antes dos experimentos, foram implantados catéteres de silastic na veia jugular externa direita dos ratos, de acordo com os procedimentos descritos por Harms e Ojeda (1974). Tal catéter, preenchido com solução salina heparinizada (25UI/mL), foi conduzido, subcutaneamente, para a região dorsal do pescoço e então exteriorizado. Meia hora antes da sessão experimental, uma extensão de polietileno (PE 50) foi conectada à cânula jugular para permitir a realização das coletas seriadas de sangue sem manipulação dos animais.

No final das sessões experimentais, os animais foram sacrificados através da inalação de dióxido de carbono. O corante Blue Evans injetado no terceiro ventrículo cerebral possibilitou a observação do posicionamento da cânula. Somente os dados dos ratos que tiveram a cânula localizada corretamente no terceiro ventrículo cerebral foram analisados estatisticamente.

4.3 DROGAS E MICROINJEÇÕES

As seguintes drogas opiatérgicas foram utilizadas no presente trabalho: ICI 199.441 (agonista específico dos receptores kappa-opioides) e Nor-binaltorfimina (nor-BNI; antagonista seletivo dos receptores kappa-opioides). Todas essas drogas foram injetadas no terceiro ventrículo cerebral após diluição em solução salina isotônica estéril, a qual também serviu como controle.

As injeções intracerebroventriculares foram realizadas com microseringas Hamilton (Hamilton Co. Inc.) conectadas, através de tubo de polietileno (PE 10), a agulha do tipo Mizzy Slide Pak do tamanho da Cânula guia. O volume de injeção, sempre de 2 µl, foi administrado ao tempo de noventa segundos.

4.4 COLETAS SANGUÍNEAS

As coletas de sangue foram efetuadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, utilizando seringas de 1mL. O tempo zero constitui a amostra sanguínea pré-droga (valores basais), ou seja, a amostra coletada imediatamente antes das injeções centrais. Em todos os outros tempos as amostras foram coletadas após a injeção intracerebroventricular das drogas. O volume de sangue removido em cada tempo foi de 0.4 mL e, para evitar hipovolemia, igual volume de solução salina heparinizada, a 37°C, foi utilizada para reposição. Depois da centrifugação das amostras sanguíneas, o plasma, acondicionado em tubos Eppendorf, foi mantido a temperatura de 20°C negativos até a dosagem da glicose. O método utilizado para tal dosagem foi a da glicose oxidase, através de kits comerciais (Glucox 500) adquiridos da DOLES (Goiânia, Brasil).

Os níveis plasmáticos de insulina foram aferidos utilizando a técnica de radioimunoensaio (RIA). Para esta mensuração, usamos kits de RIA específicos para insulina de ratos adquiridos junto a Linco Research (St. Charles, MO, USA). Tal dosagem foi realizada na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Fisiologia e Biofísica, no Laboratório de Endocrinologia e Farmacologia.

4.5 ESTRESSE DE CONTENÇÃO

Os animais, imediatamente após receberem injeções no terceiro ventrículo cerebral do antagonista kappa-opiídeos (nor-BNI), foram submetidos ao estresse de imobilização. Nas sessões experimentais com estresse, foi utilizado um aparelho estressador constituído de tubos de PVC. Estes últimos possuem 20 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno. Devido a estas dimensões, os tubos PVC promovem restrições nos movimentos, sem causar sinais aparentes de dor. Cada tubo foi ocluído na extremidade anterior por uma tampa de PVC, a qual tem um orifício central que permite a passagem do focinho, para que o animal possa respirar normalmente. Outra tampa com as

mesmas características da anterior foi adicionada na extremidade posterior, permitindo passagem da cauda. Todos os tubos possuem uma abertura na porção superior, próximo à extremidade anterior. Tal abertura permitiu a exposição das cânulas implantadas no 3º ventrículo e na veia jugular, possibilitando, desta forma, as coletas sanguíneas durante o estresse.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar os efeitos das drogas ou do veículo (salina) nos níveis glicêmicos, as concentrações de glicose plasmática obtidas nos vários tempos pós-drogas foram subtraídas daquelas mensuradas antes de cada tratamento realizado. Os valores dos deltas resultantes dos diferentes tratamentos foram analisados por meio de programa estatístico (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, San Rafael, CA) que realiza análise de variância (one way analysis of variance – ANOVA) e, subseqüentemente, submete os dados ao pós-teste de Student-Newman-Keuls. Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4.7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A cirurgia de canulação estereotáxica do terceiro ventrículo cerebral era realizada imediatamente após a chegada dos animais ao laboratório, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências. Após o término de tal procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em caixas individuais durante sete dias antes da realização das sessões experimentais. No sexto dia, contado a partir do momento da canulação do terceiro ventrículo, catéteres de silastic foram implantados na veia jugular externa direita dos ratos, sendo o experimento realizado no dia seguinte.

Os animais submetidos a jejum não tiveram acesso à ração por dezoito horas antes da sessão experimental, ou seja, retirou-se o alimento das gaiolas individuais às 18h00min do dia anterior ao experimento. Cabe ressaltar que as

sessões experimentais tiveram início sempre as 12h00min, com a administração intracerebroventricular das drogas anteriormente descritas. Em todos os casos, foram colhidas amostras de sangue imediatamente antes da injeção central das drogas usadas, que serviram como controles pré-droga (tempo 0'). Imediatamente após essa injeção, procederam-se as demais coletas seriadas de sangue, nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os animais dos grupos controles receberam injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica nos mesmos moldes em que foram feitas as injeções centrais das drogas.

Ao término das sessões experimentais, todas as amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas e o plasma estocado em freezer sob temperatura de 20°C negativos, para posterior dosagem. Os animais foram sacrificados com inalação de dióxido de carbono, e o corante Blue Evans injetado intracerebroventricularmente permitiu a visualização da localização da cânula. Cabe ressaltar, mais uma vez, que apenas os dados dos animais que tiveram a cânula localizada corretamente no terceiro ventrículo foram analisados estatisticamente.

4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Grupo Experimental I- Efeito da administração central do agonista dos receptores kappa-opiídeos ICI 199.441 sobre a glicemia em ratos não estressados submetidos a jejum.

Três diferentes grupos de animais receberam injeção intracerebroventricular de ICI 199.441 nas doses 0,02 (n= 11); 1,17 (n=08) e 4,68 nmol (n=16). As amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 minuto (antes da injeção do ICI 199.441) e após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da droga.

Um grupo controle de animais (n=08) recebeu injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica sendo colhidas amostras de sangue nos mesmos tempos dos grupos experimentais.

Grupo Experimental II- Efeito do pré-tratamento farmacológico dos receptores kappa-opioides centrais pelo antagonista seletivo nor-BNI sobre a glicemia em ratos não estressados submetidos a jejum e tratados com ICI 199.441.

Três diferentes grupos de animais foram pré-tratados com injeção intracerebroventricular de nor-BNI nas doses 0,04 (n=07); 0,08 (n=09) e 1,6 nmol (n= 08) e, posteriormente, receberam a dose mais eficaz do ICI 199.441, verificada no grupo experimental I. As amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 minuto (antes da injeção do nor-BNI) e após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da droga.

Um grupo controle de animais (n=09) recebeu injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica seguida de ICI 199.441, sendo colhidas amostras de sangue nos mesmos tempos dos grupos experimentais.

Grupo Experimental III- Efeito da administração central do antagonista dos receptores kappa-opioides nor-BNI sobre a glicemia em ratos não estressados submetidos a jejum.

Três diferentes grupos contendo oito animais cada receberam, respectivamente, injeção intracerebroventricular de nor-BNI nas doses 0,04; 0,08 e 1,6 nmol. As amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 minuto (antes da injeção do antagonista) e após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da droga.

Um grupo controle de animais (n=08) recebeu injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica, colhendo-se amostras de sangue nos mesmos tempos dos grupos experimentais.

Grupo Experimental IV- Efeito da administração central do antagonista dos receptores kappa-opioides nor-BNI sobre a glicemia em ratos em jejum submetidos ao estresse de contenção.

Três diferentes grupos de animais receberam injeção intracerebroventricular de nor-BNI nas doses 0,04 (n=10); 0,08 (n=09) e 1,6 nmol (n=11). Imediatamente após a infusão do nor-BNI os animais foram submetidos ao estresse de contenção. As amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 minuto (antes da injeção do antagonista) e após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da droga.

Um grupo controle de animais (n=10) recebeu injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica e foi submetido ao estresse de contenção. As amostras de sangue foram colhidas nos mesmos tempos dos grupos experimentais.

Grupo Experimental V- Efeito da administração central do agonista dos receptores kappa-opioides ICI 199.441 sobre a insulina em ratos não estressados submetidos a jejum.

Um grupo contendo vinte e cinco animais recebeu injeção intracerebroventricular de ICI 199.441 na dose de 4,68 nmol. As amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 minuto (antes da injeção do ICI 199.441) e após 60 e 120 minutos da administração da droga.

Um grupo controle de animais (n=15) recebeu injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica sendo colhidas amostras de sangue nos mesmos tempos dos grupos experimentais.

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO EXPERIMENTAL I

Como se pode observar na figura 1, os animais controles não estressados e submetidos a privação alimentar de dezoito horas, que receberam injeção intracerebroventricular de solução salina isotônica, não apresentaram, como esperado, variações significativas dos níveis glicêmicos. Entretanto, a administração no terceiro ventrículo cerebral do agonista seletivo dos receptores opiatérgicos do tipo kappa (ICI 199.441) promoveu aumento, estatisticamente significativo, dos níveis glicêmicos dos ratos quando tais níveis são comparados com os do grupo controle que recebeu solução salina isotônica.

No grupo que recebeu injeção intracerebroventricular de ICI 199.441 na dose de 0,02 nmol nota-se efeito hiperglicemiante significativo que se manifesta apenas no final da sessão experimental, ao tempo de 120 minutos. Diversamente, nos ratos que receberam esta droga nas doses de 1,17 nmol e 4,68 nmol, foi possível observar aumento significativo dos níveis glicêmicos. A resposta hiperglicêmica obtida com a administração do agonista kappa opióide nas doses intermediária e maior pode ser observada aos 60 minutos, extendendo-se por todo o período experimental.

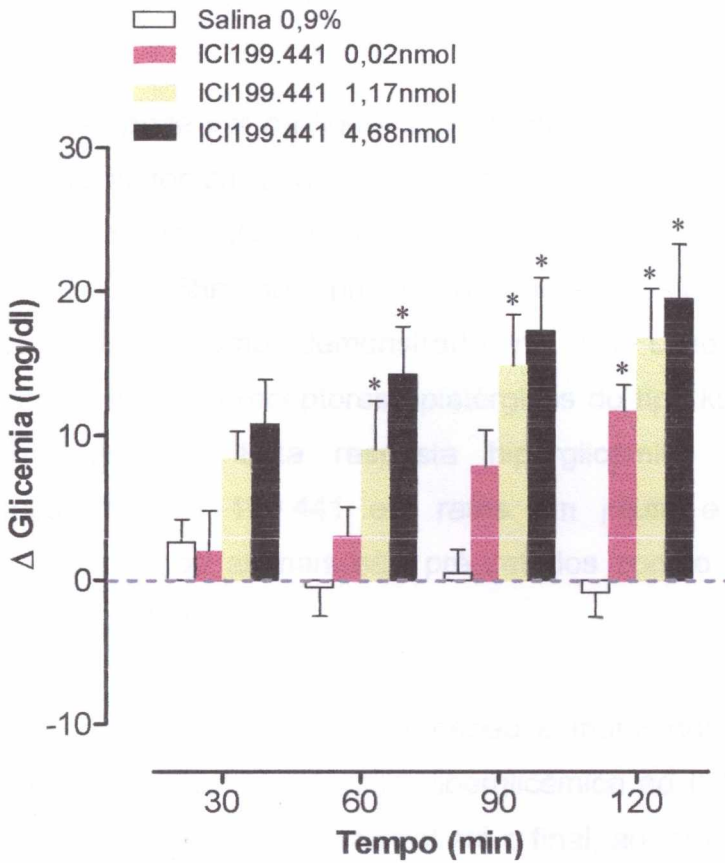


FIGURA 1: efeitos das injeções, no terceiro ventrículo cerebral, de ICI 199.441, em diferentes doses, ou salina sobre os níveis glicêmicos de ratos Wistar machos em jejum. As concentrações plasmáticas de glicose pré-injeção e o número de animais em cada grupo mostrado no gráfico acima foram de salina $78,1 \pm 4,37$ $n=08$; ICI 199.441 0,02 nmol $104,6 \pm 2,10$ $n=11$; ICI 199.441 1,17 nmol $101,6 \pm 2,98$ $n=08$; ICI 199.441 4,68 nmol $99,3 \pm 2,05$ $n=16$. Resultados foram expressos em mg/dl (média+EPM) dos valores numéricos correspondentes aos deltas de variação da glicemia em relação aos valores basais pré-injeção. Resultados da ANOVA para cada período de tempo foram $F(3,39)= 2,54$ $p= 0,07$ aos 30 min; $F(3,39)= 5,75$ $p= 0,002$ aos 60 min; $F(3,39)= 4,40$ $p= 0,009$ aos 90 min; $F(3,39)= 5,86$ $p= 0,002$ aos 120min. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa (Pós-teste de Student-Nuwan-Keuls; $p<0,05$) entre os grupos que receberam ICI 199.441 em relação ao grupo que recebeu salina.

5.2 GRUPO EXPERIMENTAL II

Como se pode ver na figura 2, nos animais controles pré-tratados com solução salina isotônica, a administração intracerebroventricular do agonista seletivo kappa-opiíide (ICI 199.441), na dose mais eficaz observada no grupo experimental I (4,68nmol), promoveu aumento significativo dos níveis glicêmicos. Assim, como demonstrado no *set* experimental anterior, a estimulação central dos receptores opiatérgicos do tipo kappa pelo ICI 19.441 produz hiperglicemia. Esta resposta hiperglicêmica observada após a administração de ICI 199.441 em ratos em jejum e não-estressados é bloqueada quando os animais são pré-tratados com o antagonista seletivo kappa opiíide nor-BNI.

No grupo experimental que recebeu a maior dose desse antagonista (0,16 nmol), o bloqueio da resposta hiperglicêmica ao ICI 199.441 é evidente desde o início da sessão experimental até o final, ao tempo 120 minutos. Com a injeção da nor-BNI na dose intermediária (0,08 nmol), o bloqueio da hiperglicemia induzida pelo agonista kappa-opiíide foi observado até o tempo 90 minutos. A nor-BNI quando administrada na dose de 0,04 nmol foi capaz de bloquear significativamente a hiperglicemia, apenas nos tempos 30 e 60 minutos.

Cabe destacar que no tempo 90 minutos as concentrações glicêmicas dos ratos que receberam a nor-BNI nas doses 0,16 e 0,08 nmol são significativamente menos elevadas do que aquelas apresentadas pelos animais aos quais foi administrada esta droga na dose de 0,04 nmol. No tempo 120 minutos, observa-se que os valores glicêmicos apresentados pelos animais que receberam nor-BNI na dose 0,16 nmol foram significativamente menores do que os níveis de glicemia apresentados pelo grupo de animais que receberam este mesmo composto na dose de 0,04 nmol.

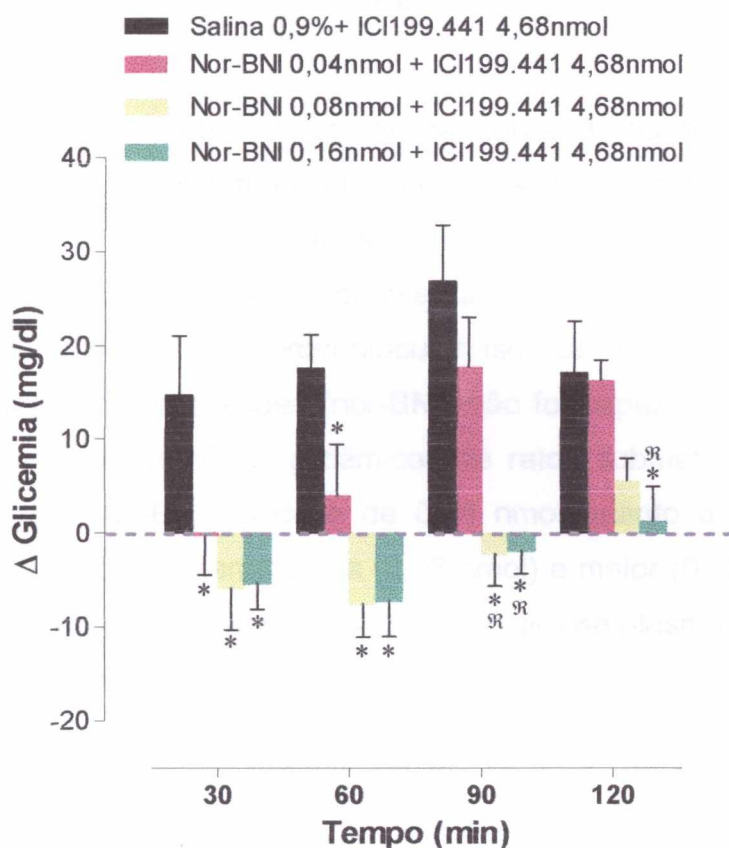


FIGURA 2: efeito do pré-tratamento central com a nor-binaltorfimina, em diferentes doses, ou salina na hiperglicemia obtida pela administração do ICI 199.441 na dose de 4,68 nmol. As concentrações plasmáticas de glicose pré-injeção e o número de animais em cada grupo mostrado no gráfico acima foram de salina+ICI 199.441 4,68 nmol $118,9 \pm 3,62$ n=09; nor-BNI 0,04 nmol+ICI 199.441 4,68 nmol $105,9 \pm 3,97$ n=07; nor-BNI 0,08 nmol+ICI 199.441 4,68 nmol $125,3 \pm 4,70$ n=09; nor-BNI 0,16 nmol + ICI 199.441 4,68 nmol $113,0 \pm 4,66$ n=08. Dados expressos em mg/dl (média+EPM) dos valores numéricos correspondentes aos deltas de variação da glicemia em relação aos valores basais pré-injeção. Resultados ANOVA para cada período de tempo foram $F(3,29) = 4,26$ p= 0,01 aos 30 min; $F(3,29) = 9,29$ p= 0,0002 aos 60 min; $F(3,29) = 10,5$ p= <0,0001 aos 90 min; $F(3,29) = 4,1$ p= 0,001 aos 120min. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa (Pós-teste de Student-Nuwann-Keuls; p<0,05) entre o grupo que recebeu o pré-tratamento com salina (controles) e os animais pré-tratados com nor-binaltorfimina em diferentes doses. O símbolo ℞ representa diferença, estatisticamente significativa, entre as dose do nor-BNI; 0,08 e 0,16 nmol com a dose de 0,04 nmol aos 90 minutos; 0,16 nmol com a dose 0,04 nmol aos 120 minutos.

5.3 GRUPO EXPERIMENTAL III

Como se pode observar na figura 3, os animais controles não-estressados, em jejum, que receberam solução salina isotônica no terceiro ventrículo cerebral, não apresentaram variações glicêmicas significativas ao longo de todo o período experimental. Assim como a injeção de salina, a administração intracerebroventricular isolada do antagonista seletivo dos receptores kappa-opioides (nor-BNI) não foi capaz de promover alterações significativas nos níveis glicêmicos de ratos submetidos a jejum. Tanto a injeção de nor-BNI na dose de 0,04 nmol quanto a administração desta droga nas doses intermediária (0,08 nmol) e maior (0,16 nmol) não alteram, de modo estatisticamente significativo, a glicose plasmática dos animais.

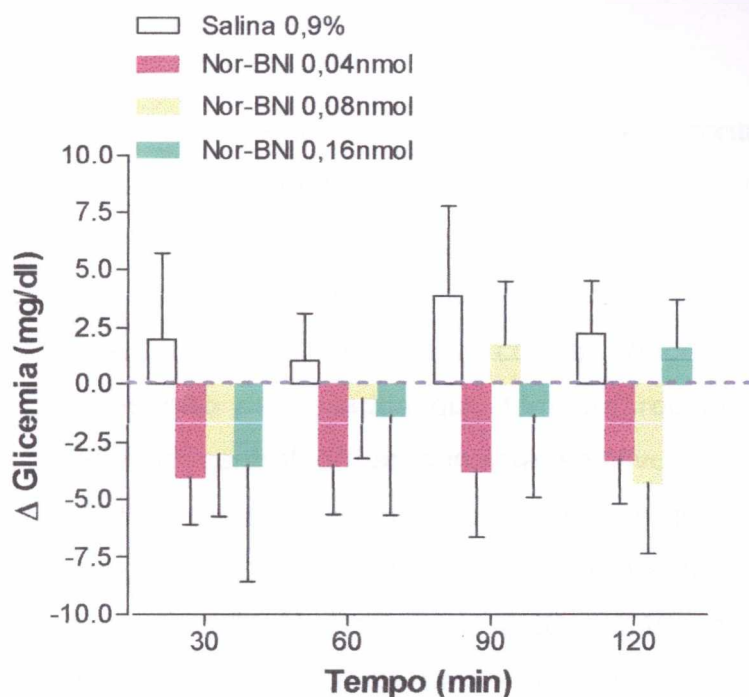


FIGURA 3: efeitos das administrações no terceiro ventrículo cerebral de norbinaltorfimina, em diferentes doses, ou salina sobre os níveis glicêmicos de ratos Wistar machos em jejum. As concentrações plasmáticas de glicose pré-injeção e o número de animais em cada grupo mostrado no gráfico acima foram de salina $105,4 \pm 4,07$ $n=08$; nor-BNI 0,04 nmol $111,9 \pm 3,0$ $n=08$; nor-BNI 0,08 nmol $109,6 \pm 3,39$ $n=08$; nor-BNI 0,16 nmol $129,9 \pm 4,30$ $n=08$. Dados expressos em mg/dl (média+EPM) dos valores numéricos correspondentes aos deltas de variação da glicemia em relação aos valores basais pré-injeção. Resultados ANOVA para cada período de tempo foram $F(3,28)= 0,601$ $p= 0,6197$ aos 30 min; $F(3,28)= 0,408$ $p= 0,7484$ aos 60 min; $F(3,28)= 1,04$ $p= 0,3889$ aos 90 min; $F(3,28)= 1,91$ $p= 0,1501$ aos 120min. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa (Pós-teste de Student-Nuwan-Keuls; $p<0,05$) entre os grupos que receberam norbinaltorfimina em relação ao grupo que recebeu salina.

5.4 GRUPO EXPERIMENTAL IV

A figura 4 torna evidente que nos animais controles em jejum, a administração intracerebroventricular de solução salina isotônica seguida pelo estresse de contenção produz hiperglicemia. Ou seja, o estresse de contenção causa aumento estatisticamente significativo nas concentrações de glicose plasmática dos ratos quando comparadas com as concentrações glicêmicas de animais controles não estressados que também receberam solução salina isotônica. A injeção central do antagonista seletivo dos receptores kappa-opioides (nor-BNI), imediatamente antes do estresse de contenção foi incapaz de reduzir a resposta hiperglicêmica induzida pelo estresse de contenção. A administração de nor-BNI nas doses de 0,08 e 0,16 nmol que promoveram bloqueio da hiperglicemia induzida pela estimulação central dos receptores kappa-opioides não reduziu o efeito hiperglicemiante do estresse de contenção. A injeção de nor-BNI na dose mais elevada utilizada nesse estudo (0,32 nmol) foi também incapaz de diminuir a hiperglicemia gerada pelo estresse de contenção.

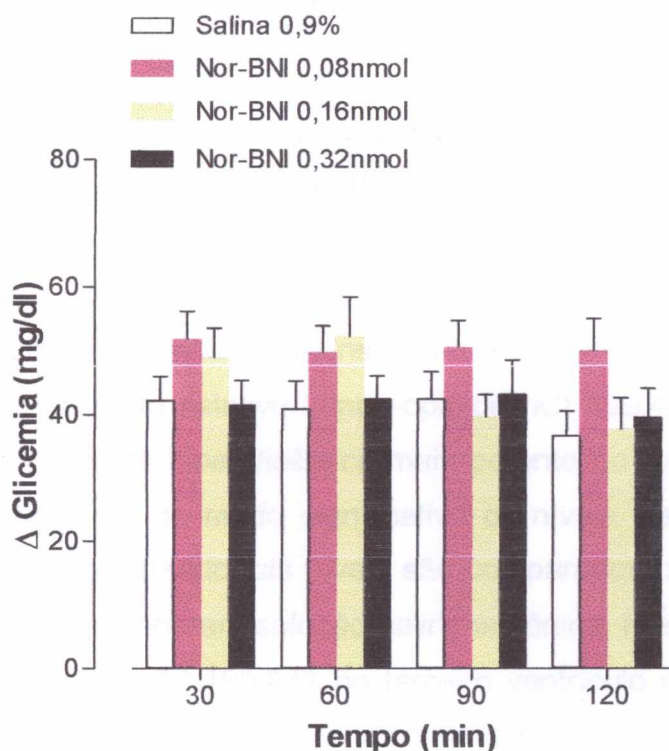


FIGURA 4: efeitos das injeções, no terceiro ventrículo cerebral, da nor-binaltorfimina, em diferentes doses, ou salina sobre a hiperglicemia induzida pelo estresse de contenção em ratos Wistar machos em jejum. As concentrações plasmáticas de glicose pré-injeção e o número de animais em cada grupo mostrado no gráfico acima foram de salina $83,8 \pm 2,42$ $n=10$; nor-BNI 0,08 nmol $104,8 \pm 3,17$ $n=10$; nor-BNI 0,16 nmol $92,3 \pm 2,64$ $n=09$; nor-BNI 0,32 nmol $97,2 \pm 3,86$ $n=11$. Dados expressos em mg/dl (média+EPM) dos valores numéricos correspondentes aos deltas de variação da glicemia em relação aos valores basais pré-injeção. Resultados ANOVA para cada período de tempo foram $F(3,36)= 1,46$ $p= 0,2415$ aos 30 min; $F(3,36)= 1,35$ $p= 0,2727$ aos 60 min; $F(3,36)= 1,02$ $p= 0,3962$ aos 90 min; $F(3,36)= 1,72$ $p= 0,1807$ aos 120min. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa (Pós-teste de Student-Nuwann-Keuls; $p<0,05$) entre os grupos que receberam nor-binaltorfimina em relação ao grupo que recebeu salina.

5.5 GRUPO EXPERIMENTAL V

Como evidente na figura 5 e à semelhança do que é observado nas sessões experimentais I e III, os animais controles não-estressados, submetidos a jejum, que receberam solução salina isotônica no terceiro ventrículo cerebral, não apresentaram alterações significativas nas concentrações plasmáticas de insulina nos tempos estudados. A administração central do agonista seletivo kappa-opiíide (ICI 199.441), na dose em que se observou resposta hiperglicêmica mais potente no experimento anterior (4,68 nmol), não altera de modo significativo os níveis plasmáticos de insulina de ratos em jejum, quando tais níveis são comparados com aqueles dos animais controles que receberam solução salina isotônica. Mesmo após duas horas da administração do ICI 199.441 no terceiro ventrículo cerebral de ratos não foi possível observar alterações significativas nas concentrações plasmáticas de insulina.

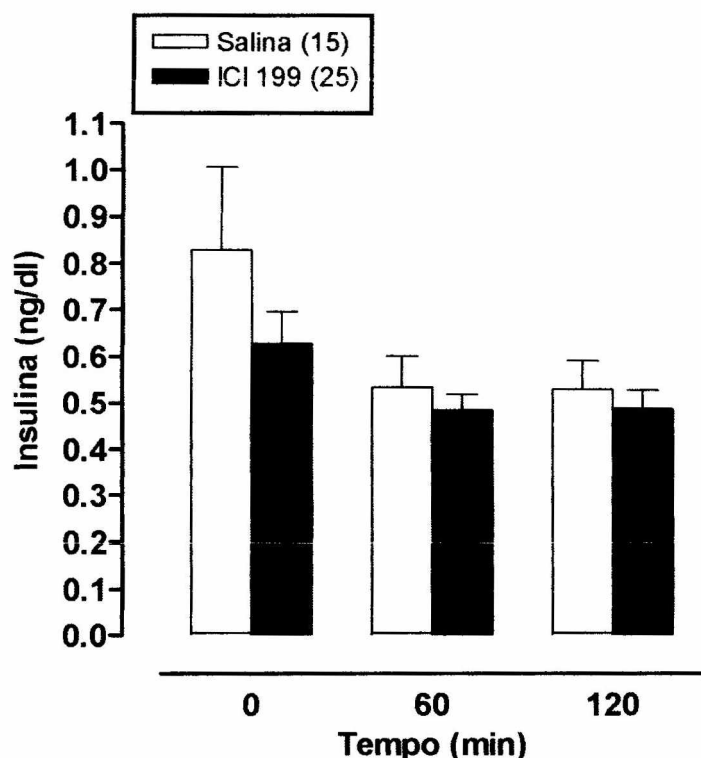


FIGURA 5: efeito da injeção no terceiro ventrículo cerebral de ICI 199.441, na dose de 4,48 nmol, ou salina sobre os níveis plasmáticos de insulina de ratos Wistar machos em jejum. Dados expressos em ng/dl (média±EPM) dos valores absolutos em cada tempo salina: 0.829±0.1761 aos 0 minutos; 0.535±0.0664 aos 60 minutos; 0.530±0.0616 aos 120 minutos; ICI 199.441 0.628±0.0680 aos 0 minutos; 0.485±0.0351 aos 60 minutos; 0.489±0.0399 aos 120 minutos. Resultados ANOVA por tempo foram: Tempo 0' $F(1,39) = 1,55$ $P = 0,22$; Tempo 60' $F(1,39) = 0,536$ $P = 0,47$; Tempo 120' $F(1,39) = 0,346$ $P = 0,56$. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa (Pós-teste de Student-Nuwan-Keuls; $p < 0,05$) entre os grupos que receberam ICI 199.441 em relação ao grupo que recebeu salina.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam achados inéditos sobre a participação do sistema opiatérgico central e seus receptores específicos na glicorregulação. Neste estudo demonstramos que a estimulação dos receptores kappa-opiídeos centrais, através da injeção do agonista seletivo ICI 199.441 no terceiro ventrículo cerebral de ratos em jejum, produziu aumento significativo dos níveis de glicose plasmática. Nas três doses estudadas (0,02, 1,17 e 4,68 nmol), o ICI 199.441 administrado intracerebroventricularmente foi capaz de promover aumento significativo na glicemia de ratos em jejum não submetidos ao estresse de contenção. A resposta hiperglicemiante mais potente foi observada com a injeção do ICI 199.441 na dose de 4,68 nmol e, deste modo, tal dose foi escolhida para ser utilizada nos experimentos subseqüentes.

O efeito hiperglicêmico produzido pela ativação central dos receptores kappa-opiídeos foi bloqueado, de maneira estatisticamente significativa, pelo pré-tratamento central com o antagonista seletivo para os receptores opiatérgicos do tipo kappa, a nor-binaltorfimina. Cabe destacar que, a administração da nor-binaltorfimina na maior dose (0,16 nmol) foi capaz de bloquear o efeito hiperglicêmico do ICI 199.441 (4,68 nmol) durante todo o período experimental, ou seja, do tempo 30 aos 120 minutos.

A nor-binaltorfimina, administrada isoladamente no terceiro ventrículo cerebral, não alterou de modo significativo os níveis glicêmicos de ratos em jejum não estressados, nas três doses estudadas. A injeção de nor-binaltorfimina imediatamente antes do estresse de contenção foi incapaz de reduzir a hiperglicemia produzida pelo estresse de contenção. Apesar de alterar a glicemia de ratos em jejum, o ICI 199.441 não modifica de modo significativo, as concentrações plasmáticas de insulina.

O papel dos subtipos de receptores opiatérgicos centrais na regulação da glicemia tem sido muito pouco estudado, se considerarmos a importância

das drogas opiatérgicas na prática médica. A quantidade de trabalhos disponíveis na literatura que investigam a participação dos receptores opiatérgicos centrais do tipo kappa na glicorregulação é ainda mais escassa, o que dificulta a análise comparativa dos dados obtidos no presente estudo. Diante destes fatos, podemos afirmar que nosso trabalho representa uma das poucas referências que analisa a importância dos receptores kappa-opiíides centrais no controle da homeostase glicêmica.

De qualquer maneira, o efeito hiperglicêmico induzido pela ativação dos receptores kappa-opiíides centrais era esperado, visto que outros trabalhos já demonstraram que a estimulação central do sistema opiatérgico, utilizando drogas agonistas não específicas, produz hiperglicemia (BORISON et al., 1962). A morfina, por exemplo, que estimula de modo não seletivo os receptores opiatérgicos, quando administrada tanto por via periférica (RADOSEVICH et al., 1984) quanto em regiões específicas do SNC (FELDBERG e GUPTA, 1974) produz aumento significativo dos níveis plasmáticos de glicose. A injeção da morfina por via intracerebroventricular também causa hiperglicemia em animais (FELDBERG e SHALIGRAM, 1972).

Outro estudo demonstrou que a administração endovenosa de morfina produz hiperglicemia em ratos. Descreve-se ainda que o efeito hiperglicemiante dessa droga foi observado dos primeiros cinco até vinte e cinco minutos após sua injeção. Entretanto, quando a morfina foi infundida dez minutos depois da administração de naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opiatérgicos) não houve aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicose. Ou seja, a resposta hiperglicêmica induzida pela morfina foi efetivamente abolida pelo pré-tratamento com a naloxona (JOHANSEN et al., 1992).

A beta-endorfina, que estimula os receptores opiatérgicos do tipo μ , também produz hiperglicemia quando administrada no terceiro ventrículo cerebral em ratos. Tanto a naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opiatérgicos) quanto a beta-funaltrexamina (antagonista seletivo dos receptores μ -opiíides) bloquearam a hiperglicemia induzida pela beta-endorfina (GUNION

et al., 1991). Em ratos, a injeção intracisternal de beta-endorfina causa aumento das concentrações plasmáticas de glicose, de maneira dose dependente. Neste estudo, a hiperglicemia induzida pela administração de beta-endorfina na dose de 7,25 nmol tem início nos primeiros sete minutos do experimento e perdura por duas horas e trinta minutos (APPEL et al., 1987). Em nossas sessões experimentais, foi observado que a injeção intracerebroventricular do ICI 199.441 na maior dose (4,68 nmol) também produz efeito hiperglicêmico que dura até duas horas após sua administração.

Assim como no trabalho descrito acima, em nosso estudo as drogas opiatérgicas foram administradas no terceiro ventrículo cerebral de ratos. A duração da resposta hiperglicemiante obtida pela estimulação dos receptores kappa-opiídeos centrais foi muito semelhante àquela observada após a ativação dos receptores opiatérgicos do tipo μ centrais. Isto parece sugerir que a estimulação farmacológica de ambos os tipos de receptores opiídeos parece deflagrar mecanismos centrais de indução da resposta hiperglicêmica que são similares.

Gunion e colaboradores (1991) mostraram que a estimulação seletiva dos receptores μ -opiídeos centrais resulta em hiperglicemia. Esse efeito hiperglicemiante da administração do agonista μ -opiídeo específico, DAGO (Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol), no terceiro ventrículo cerebral foi revertido pelo pré-tratamento com a beta-funaltrexamina, antagonista seletivo dos receptores do tipo μ . A semelhança do que observaram estes autores, em nosso estudo também demonstramos que o pré-tratamento central com o antagonista kappa-opiídeo seletivo, nor-binaltorfimina, em diferentes doses, bloqueia de modo significativo o aumento glicêmico induzido pela injeção do ICI 199.441 no terceiro ventrículo cerebral de ratos em jejum.

Todos os dados descritos até o momento demonstram que o sistema opiatérgico participa ativamente na glicorregulação. No entanto, a participação dos receptores kappa-opiídeos centrais neste fenômeno permanece obscura. Deste modo, nosso trabalho contribuiu para esclarecer o papel seletivo dos receptores opiatérgicos centrais na regulação da homeostase da glicose. Por

serem agonista e antagonista altamente seletivos para os receptores opiatérgicos do tipo kappa, os resultados obtidos neste estudo sugerem que tais receptores participam seletivamente na glicorregulação.

Apesar da administração intracerebroventricular do ICI 199.441 promover hiperglicemia em ratos, este agonista seletivo dos receptores kappa-opioides não altera de maneira significativa a insulina plasmática de ratos em jejum, quando comparado com as concentrações plasmáticas de insulina dos animais controles que receberam solução salina isotônica. Mesmo com a injeção do ICI 199.441 na dose (4,68 nmol) que promoveu o efeito hiperglicêmico mais potente, observado no grupo experimental I, não foi possível observar alterações estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos de insulina.

Os dados obtidos no grupo experimental V permitem sugerir que a hiperglicemia induzida pela estimulação dos receptores kappa-opioides centrais pode ser decorrente da não elevação das concentrações plasmáticas de insulina. Sabe-se que níveis plasmáticos elevados de glicose estimulam, como mecanismo contra-regulatório, a liberação pancreática de insulina, mantendo, portanto, as concentrações glicêmicas na faixa de normalidade. A ativação farmacológica kappa-opioides central pode ter inibido este arco reflexo endócrino, fazendo com que a glicemia se elevasse pela ausência do mecanismo contra-regulatório acima exposto.

Estudos *in vivo* têm demonstrado que administrações endovenosas de dinorfina A (agonista seletivo dos receptores kappa-opioides) não alteram os níveis basais de insulina, em camundogos. Na presença de glicose e terbutalina (compostos que estimulam a secreção de insulina) a dinorfina A também foi incapaz de alterar a liberação desse hormônio pancreático (AHRÉN, 1989).

Giugliano (1984) sugeriu que em estudos animais *in vivo*, a hiperglicemia induzida pela administração central de agonistas opiatérgicos ou de peptídeos opioides endógenos é resultante da ação direta do sistema nervoso simpático e

da inibição da secreção de insulina. Em estudos com administração periférica, o aumento nas concentrações plasmáticas de glicose é obtido pela estimulação da secreção pancreática de glucagon. É descrito na literatura que a secreção pancreática de insulina é dependente não somente da concentração plasmática de glicose, como também da estimulação do sistema nervoso parassimpático. Além disso, a ativação do sistema simpático promove inibição na liberação de insulina.

Sabe-se que o nível plasmático de glicose é continuamente regulado pelo sistema nervoso autônomo (SNA), através de ações diretas sobre o fígado e pâncreas, que participam da regulação do metabolismo. Deste modo, independente do perfil alimentar do animal, o SNA equilibra a produção e o consumo de glicose, mantendo os níveis glicêmicos dentro da faixa de normalidade. Já foi demonstrada a existência de inervação autonômica no pâncreas. A estimulação elétrica do nervo vago e dos nervos esplênicos altera as secreções pancreáticas de insulina e glucagon, além de modificar o débito hepático de glicose (SMYTHE et al., 1989).

Além de regular a resposta do organismo ao estresse, o hipotálamo é considerado a principal região do SNC que atua na glicorregulação, especialmente o hipotálamo ventromedial (HVM) e o hipotálamo lateral (HL) (SHIMAZU, 1979, 1981). É descrito que o HVM possui neurônios glicossensitivos, os quais respondem à hipoglicemia pela ativação autonômica simpática. Uma vez estimulado, o sistema nervoso simpático atua no fígado e pâncreas, modulando respostas hiperglicemiantes. Por outro lado, o HL faz conexão com o sistema parassimpático, via múltiplas projeções para os núcleos do trato solitário e dorsomotor do vago. Esses ramos, então, alcançam o fígado e o pâncreas onde vão influenciar a glicemia (SHIMAZU, 1983). Deste modo, efeitos hiperglicemiantes como aumento das concentrações plasmáticas de glucagon e a glicogenólise hepática são provocadas em ratos pela estimulação elétrica do HVM. Já a área lateral hipotalâmica, quando estimulada eletricamente, produz hipoglicemia, sendo capaz de reduzir a gliconeogênese hepática (OOMURA e KITA, 1981).

Appel e colaboradores (1987) demonstraram que a injeção intracisternal de beta-endorfina aumenta, de maneira dose-dependente, a glicemia de ratos. Nesses animais, a beta-endorfina elevou as concentrações plasmáticas de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) e glucagon, sem alterar os níveis de insulina. Tais autores também observaram que a hiperglicemia induzida pela estimulação dos receptores μ -opióides é revertida pelo bloqueio glanglionar feito pela clorisondamina, demonstrando a participação do sistema autônomo simpático na glicorregulação.

Além da glicorregulação, o sistema simpático atua em outros parâmetros fisiológicos influenciados pelo sistema opiatérgico, por exemplo, a função renal. A administração intracerebroventricular de agonistas seletivos dos receptores opiatérgicos do tipo kappa, como U 69593, U-50488H e dinorfina A (1-17), produz aumento significativo do fluxo urinário e da atividade do nervo simpático renal e redução estatisticamente significativa da excreção urinária de sódio em ratos. O efeito diurético e a atividade simpática do nervo renal produzida pela estimulação kappa-opióide são bloqueados pelo pré-tratamento central dos animais com a nor-binaltorfimina (CRAFT et al., 2000, KAPUSTA e OBIH, 1993). Acredita-se que as respostas diurética e antinatriurética dos receptores kappa-opióides são dependentes da inibição da secreção de vasopressina (LEANDER et al., 1985) e da estimulação do sistema nervoso simpático respectivamente (KAPUSTA e OBIH, 1993).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo e das informações encontradas na literatura, acreditamos que o aumento da glicemia promovido pela estimulação dos receptores kappa-opióides centrais possa ser dependente da ativação do sistema nervoso simpático. Cabe salientar que as drogas opiatérgicas utilizadas neste trabalho foram injetadas no terceiro ventrículo cerebral, região do SNC muito próxima aos núcleos hipotânicos, os quais, conforme descrito anteriormente, são considerados áreas centrais no controle da glicemia.

Os múltiplos mecanismos de controle do metabolismo intermediário, tanto em nível central quanto periférico, tendem a induzir aumento da produção

hepática de glicose às custas do aumento da neoglicogênese, em animais em jejum, e da glicogenólise em animais alimentados. Como no presente trabalho os animais foram submetidos a privação alimentar, sugerimos que a hiperglicemia obtida pela estimulação kappa-opiíide central possa ser resultante da ativação da gliconeogênese hepática induzida pelo sistema nervoso simpático.

A administração intracerebroventricular de nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores kappa-opiíides) não altera significativamente a glicemia em ratos, quando os resultados foram comparados aos de animais controle que receberam solução salina isotônica. Mesmo na dose mais alta, a nor-binaltorfimina (0,16 nmol) foi incapaz de promover alterações estatisticamente significativas nas concentrações plasmáticas de glicose. Este dado é extremamente importante para demonstrar que os resultados obtidos nesse trabalho são decorrentes da ação farmacológica sobre os receptores kappa-opiíides centrais. Ou seja, a ausência de efeito observado após o bloqueio seletivo dos receptores opiatérgicos do tipo kappa revela a inexistência de um tônus endógeno regulando a glicemia em ratos.

Contudo, não podemos excluir que em outras situações que não o controle dos níveis glicêmicos basais o componente kappa-opiíide central possa desempenhar um papel fisiológico importante ou que um aumento na dose do antagonista opiíide empregado pudesse ter sido necessário para demonstrar o componente de tônus opiíide endógeno atuando na glicorregulação que, nas condições experimentais que usamos, deixou de ser demonstrado.

A literatura demonstra que o estresse induz aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicose. Acredita-se que a hiperglicemia induzida pelo estresse é decorrente da ativação do eixo hipotâmo-hipófise-adrenal. O hipotálamo consiste na principal região do SNC que atua na resposta adaptativa do organismo ao estresse. Os neurônios CRH-érgicos localizados especialmente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) estimulam a

secreção de ACTH pela hipófise anterior. O ACTH circulante atua no córtex da glândula supra-renal onde induz a liberação de corticosterona. Sabe-se que a corticosterona estimula a secreção de glicocorticóides que possuem efeitos diabotogênicos importantes. Além disso, níveis elevados de corticosterona aumentam de modo significativo a produção hepática de glicose. A corticosterona é também responsável por inibir a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, elevando os níveis plasmáticos de glicose (ADAM e EPEL, 2007).

Existem evidências de que os receptores mu, delta e kappa estão envolvidos nas respostas adaptativas do organismo ao estresse, regulando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Tais observações são reforçadas pela presença dos peptídeos opióides endógenos, encefalina e dinorfina, em regiões hipotalâmicas (WATSON et al., 1982). O agonista seletivo dos receptores opiatérgicos do tipo kappa, U50488H, eleva os níveis plasmáticos de corticosterona, quando injetado por via intraperitoneal. Em ratos hipofisectomizados, o U50488H não aumentou, de modo significativo, as concentrações plasmáticas de corticosterona (SMRITI et al., 1986). Mellon e Bayer (1998) também observaram que a nor-binaltorfimina não foi capaz de bloquear o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona induzido pela morfina. O efeito redutor sobre as concentrações de corticosterona só foi obtido com a administração do antagonista seletivo dos receptores μ -opióides, conhecido com CTOP.

Em nosso laboratório, já demonstramos que o estresse de contenção produz efeito hiperglicêmico em ratos (CARVALHO et al., 2002). No presente estudo, os resultados foram semelhantes àqueles obtidos em trabalhos anteriores. Ou seja, o estresse de contenção também causou potente hiperglicemia nos animais que receberam injeções de solução salina isotônica no terceiro ventrículo cerebral. Entretanto, o bloqueio farmacológico seletivo dos receptores kappa-opióides, imediatamente antes do estresse de contenção, foi incapaz de reduzir a hiperglicemia induzida pelo estresse.

Parece, portanto, que no estresse de contenção, considerado de média intensidade, o componente kappa-opiídeo central não é importante para a deflagração da resposta hiperglicemiante em animais. Contudo, em outros tipos de estresse considerados de mais alta intensidade, como o de imobilização, a participação dos receptores kappa-opiídeos pode ser evidenciada. Suh e colaboradores (2000) demonstraram que o estresse de imobilização causa potente analgesia em ratos. Além disso, esta resposta analgésica é mediada pelos receptores opiatérgicos do tipo kappa, já que a analgesia presente nesta situação foi bloqueada pela administração intratecal ou intracerebroventricular de nor-binaltorfimina. Este é um indício de que em tipos de estresse mais potentes do que o estresse de contenção mecanismo(s) kappa-opiídeo(s) glicorregulatório(s) central(ais) possa(m) vir a ser demonstrado(s).

Coventry e colaboradores (2001) observaram que o efeito estimulatório da morfina sobre os níveis plasmáticos de corticosterona não foi alterado pelo pré-tratamento com a endomorfina do tipo 1 (EM-1). Além disso, em situação de estresse de contenção, os níveis de EM-1 e endomorfina tipo 2 (EM-2) não são modificados significativamente, quando comparados com as concentrações de EM-1 e EM-2 em animais não submetidos ao estresse. Esses dados sugerem que no estresse de contenção, o componente μ -opiídeo central parece também não participar da regulação da secreção de corticosterona.

Fica evidente que a regulação glicêmica também é influenciada pelos neurotransmissores peptidérgicos centrais. Sugere-se que a hiperglicemia obtida pela estimulação das vias opiatérgicas centrais e, como demonstrado nesse trabalho, pela ativação dos receptores kappa-opiídeos centrais se dá principalmente devido ao aumento da atividade simpática periférica, especialmente resultante da liberação adrenal de catecolaminas e dos efeitos diretos de opiídeos sobre a secreção de hormônios pancreáticos, já que a administração de determinados opiáceos pode inibir a liberação de insulina. Em estudos mais crônicos, a participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na hiperglicemia induzida pela estimulação opiatérgica deve ser destacado. No entanto, tal hipótese não pode ser descartada em estudos agudos, como o desenvolvido no presente trabalho.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a estimulação farmacológica dos receptores kappa-opioides centrais produz aumento significativo dos níveis glicêmicos de ratos não estressados e submetidos a jejum.

Portanto, é factível concluir que, nesta espécie animal, a ativação deste subtipo de receptor opiatérgico central deflagra, de alguma forma, mecanismos periféricos responsáveis por gerar resposta hiperglicêmica.

Além disto, a integridade funcional dos receptores kappa-opioides centrais parece não ser necessária para a deflagração da resposta hiperglicêmica após o estresse de imobilização, desde que o bloqueio farmacológico destes receptores não foi capaz de interferir neste processo.

A resposta hiperglicêmica gerada após a estimulação dos receptores kappa-opioides centrais cursa sem elevação dos níveis de insulina plasmática, o que pode sugerir que algum mecanismo de inibição da resposta hiperinsulinêmica frente à hiperglicemia seja responsável pela elevação das concentrações plasmáticas de glicose nesta circunstância.

Entretanto, a estimulação central desses receptores opiatérgicos não altera, de modo significativo, as concentrações plasmáticas de insulina em ratos submetidos a jejum.

É possível que esta inibição da elevação dos níveis plasmáticos de insulina frente à hiperglicemia possa ser devida à estimulação simpática periférica, a qual poderia ser também o fator periférico que deflagra a hiperglicemia após a estimulação do componente kappa-opiíde central.

8 REFERÊNCIAS

- ADAM T.C. e EPEL E.S. Stress, eating and the reward system. **Physiology and Behavior**. 91: 449-458, 2007.
- AHRÉN B. Effects of beta-endorphin, met-enkephalin and dynorphin A on basal and stimulated insulin secretion in the mouse. **International Journal Pancreatology**. 5 (2): 165-178, 1989.
- ALLAN E.H., GREEN I.C. e TITHERADGE M.A. The stimulation of glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated hepatocytes by opioid peptides. **The Biochemical Journal**. 216 (507-510); 1983.
- APPEL N.M., TRACK N.S. e VAN LOON G.R. Autonomic and endocrine participation in opioid peptide-induced hyperglycemia. **Journal Autonomic Nervous System**. 20(3): 221-231, 1987.
- BLOOM F et al. Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 75 (3): 1591-1595, 1978.
- BORISON H.L. et al. Morphine-induced hyperglycaemia in the cat. **The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 138: 229-235, 1962.
- BOTTICELLI L.J., COX B.M. e GOLDSTEIN A. Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 78 (12): 7783-7786, 1981.
- CARVALHO, F.L.Q. et al. Central 5-HT₃ receptor stimulation by m-CPBG increases blood glucose in rats. **Hormone and Metabolic Research**. 34 (2): 55-61, 2002.
- CHENG J. et al. Kappa 3 opiate receptor binding in the mouse and rat. **European Journal of Pharmacology**. 226: 15-20, 1992.
- CHENG J.T. et al. Plasma glucose-lowering effect of tramadol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**. 50: 2815-2821, 2001.
- COVENTRY T.L. et al. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Journal of Endocrinology**. 169: 185-193, 2001.
- COX B.M. et al. Opioid receptors, in the IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. **IUPHAR media**. 321-333, 2000.
- CRAFT R.M., ULIBARRI C.M. e RAUB D.J. Kappa opioid-induced diuresis in female vs male rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 65: 53-59, 2000.

- CROSS A.J., HILLE C. e SLATER P. Subtraction autoradiography of opiate receptor subtypes in human brain. **Brain Research**. 418 (2): 343-348, 1987.
- DEY P.K., FELDBERG W e WENDLANDT S. Comparison of the hyperglycaemic effect of adrenaline and morphine introduced into the liquor space. **The Journal of Physiology**. 246 (213-228); 1975.
- DRAKE C.T. et al. Kappa opioid receptors in the rostral ventromedial medulla of male and female rats. **The Journal of Comparative Neurology**. 500 (3): 465-476, 2007.
- FELDBERG W. e SHALIGRAM S.V. The hyperglycaemic effect of morphine. **British Journal of Pharmacology**. 46 (602-618); 1972.
- FELDBERG W. e GUPTA K.P. Morphine hyperglycaemia. **The Journal of Physiology**. 238 (487-502); 1974.
- FEURLE G.E., HELMSTAEDTER V. e WEBER U. Met- and leu-enkephalin immuno- and bio-reactivity in human stomach and pancreas. **Life Sciences**. 31: 2961-2969, 1982.
- GAVÉRIAUX-RUFF C. et al. Detection of opioid receptor mRNA by RT-PCR reveals alternative splicing for the delta- and kappa-opioid receptors. **Brain Research**. 48 (2): 298-304, 1997.
- GILBERT C.L. et al. The timing of parturition in the pig is altered by intravenous naloxone. **Theriogenology**. 53: 905-923, 2000.
- GILLAN M.G. e KOSTERLITZ H.W. Spectrum of the mu, delta- and kappa-binding sites in homogenates of rat brain. **British Journal of Pharmacology**. 77(3):461-469, 1982.
- GIUGLIANO D. Morphine, opioid peptides and pancreatic islet function. **Diabetes Care**. 7 (1): 92-98, 1984.
- GOLDBERG I.E. et al. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 286 1007-1013, 1998.
- GUNION M.W. et al. Mu-receptor mediates elevated glucose and corticosterone after third ventricle injection of opioid peptides. **The American Journal of Physiology**. 261: 70-81, 1991.
- HARBUZ M.S. et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in autoimmunity. **Annals of the New York Academy of Science**. 823: 214-224; 1997.
- HARMS P.G. e OJEDA S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology**. 36: 391-394, 1974.

HENRY D.J. et al. K-Opioid Receptors Couple to Inwardly Rectifying Potassium Channels when Coexpressed by *Xenopus* Oocytes. **Molecular Pharmacology**. 47 (3): 551-557, 1995.

HYTTIA P. e KIIANMAA K. Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**. 25: 25-33, 2000.

HOUCK J.C., CHANG C.M. e KIMBALL C.D. Pancreatic beta-endorphin-like polypeptides. **Pharmacology**. 23 (1): 14-23, 1981.

HSU C.T., LIU I.M. e CHENG J.T. Increase of beta-endorphin biosynthesis in the adrenal gland of streptozotocin-induced diabetics rats. **Neuroscience Letters**. 318: 57-60, 2002.

JAMES I.F. e GOLDSTEIN A. Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity. **Molecular Pharmacology**. 25 (3): 337-342, 1984.

JESSOP D.S. et al. Novel opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 are present in mammalian immune tissues. **Journal of Neuroimmunology** 106 53–59; 2000.

JOHANSEN O et al. Increments in glucose, glucagons and insulin after morphine in rats, and naloxone blocking og this effect. **Life Science**. 51 (15): 1237-1242, 1992.

JOHNSON P. et al. Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover. **Neuroreport**. 5 (4): 507-509, 1994.

JORDAN B. e DEVI L.A. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. **British Journal of Anaesthesia** 81: 12-19,1998.

JOSEPH S.A. et al. Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. **Neuroscience Letters**. 38 (3):221-225, 1983.

KAKIDANI H. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. **Nature**. 298 (5871):245-249, 1982.

KAPUSTA D.R. e OBIH J.C. Central kappa opioid receptor-evoked changes in renal fuction in conscious rats: participation of renal nerves. **The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 267: 199-204, 1993.

KELLEY A.E. et al. A pharmacological analysis of the substrates underlying conditioned feeding induced by repeated opioid stimulation of the nucleus accumbes. **Neuropharmacology**. 291: 455-267, 2000.

KIEFFER B.L. et al. The delta-opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 89 (12048-12052); 1992.

KITCHEN I. et al. Quantitative autoradiographic mapping of μ -, δ - and κ -opioid receptors in knockout mice lacking the μ -opioid receptor gene. **Brain Research** 778: 73–88, 1997.

KNUDTZON J. Effects of pro-opiomelanocortin-derived peptides on plasma levels of glucagons, insulin and glucose. **Hormone and Metabolic Research**. 18 (9): 579-583, 1986.

LEACH R.P., ALLAN E.H. e TITHERAGE M.A. The stimulation of glycogenolysis in isolated hepatocytes by opioid peptides. **The Biochemical Journal**. 227 (191-197); 1985.

LEACH R.P. e TITHERAGE M.A. The stimulation of glycogenolysis in isolated hepatocytes by opioid peptides. **The Biochemical Journal**. 238 (531-535); 1986.

LEANDER J.D., ZERBE R.L. e HART J.C. Diuresis and suppression of vasopressin by kappa opioids: comparison with mu and delta opioids and clonidine. **The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 234: 463-469, 1985.

LEE S.C. e YOBURN.C. The effect of nimodipina on opioid antagonist-induced upregulation and supersensitivity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 66: 347-351, 2000.

LI S. et al. Molecular cloning and expression of a rat K opioid receptor. **The Biochemical Journal**. 295 (629-633), 1993.

LI L.Y. e CHANG K.J. The Stimulatory Effect of Opioids on Mitogen-Activated Protein Kinase in Chinese Hamster Ovary Cells Transfected to Express μ -Opioid Receptors. **Molecular Pharmacology**. 50 (3): 599-602; 1996.

LIU I.M. et al. Activation of opioid mu-receptor by loperamide to lower plasma glucose in streptozotoci-induced diabetic rats. **Neuroscience Letters**. 265: 183-186, 1999.

MANSOUR A. et al. Opioid-receptor mRNA expression in rat CNS: anatomical and functional implications. **Trends in Neurosciences**. 18 (1): 22-29, 1995.

MATSUMURA M. et al. In vivo and in vitro effects of beta-endorphin on glucose metabolism in the rat. **Hormone and Metabolic Research**. 16 (1): 27-31, 1984.

- MELLO N.K., MENDELSON J.H. e KELLY M. Acute effects of nalmefene on LH, prolactin and testosterone in male rhesus monkeys. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 66: 275-285, 2000.
- MELLON R.D. e BAYER B.M. Role of central opioid receptor subtypes in morphine-induced alterations in peripheral lymphocyte activity. **Brain Research**. 789 (1): 56-67, 1998.
- NAKANISHI S. et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. **Nature**. 278: 423-327, 1979.
- NODA M. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal proenkephalin. **Nature**. 295 (5846):202-206, 1982.
- OOMURA, Y. e KITA, H. Insulin acting as a modulator of feeding through the hypothalamus. **Diabetologia**. 20: 290-98, 1981.
- PEGO-REIGOSA R. et al. Distribution of met-enkephalin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. **Journal of Chemical Neuroanatomy** 19: 243-258, 2000.
- PELUSO J, et al. Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. **Journal Neuroimmunology**. 81(1-2):184-92, 1998.
- PIESTRZENIEWIEZ M. K., MICHNA J., JANECKA A. Opioid receptors and their selectiva ligands. **Portepy Biochem**. 52 (3): 313-319, 2006.
- PIROS E.T. et al. Voltage-Dependent Inhibition of Ca²⁺ Channels in GH₃ Cells by Cloned μ - and δ -Opioid Receptors. **Molecular Pharmacology**. 50 (4):947-56; 1996.
- RADOSEVICH P.M. et al. Effects of Morphine on Glucose Homeostasis in the Conscious Dog. **The Journal of Clinical Investigation**. 74 (1473-1480); 1984.
- REID R.L. e YEN S.S. Beta-endorphin stimulates the secretion of insulin an glucagons in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. 52 (3): 592-594, 1981.
- SCHOLZEN T.E. et al. Expression of proopiomelanocortin peptides in human dermal microvascular endothelial cells: evidence for a regulation by ultraviolet light and interleukin-1. **The Journal of Investigative Dermatology**. 115(6):1021-1028, 2000.
- SCHREFF M. et al. Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. **Neuroreport** 9:1031-1034, 1998.

SHARMA S.K.; KLEE W.A. e NIRENBERG M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 74(8):3365-9; 1977.

SHEN S. e INGENITO A.J. Chronic blockade of hippocampal kappa receptors increases arterial pressure in conscious spontaneously hypertensive rats but not in normotensive Wistar Kyoto rats. **Clinical and Experimental Hypertension**. 22: 507-519, 2000.

SHIMAZU, T. Nervous control of peripheral metabolism. **Acta Physiologica Polonica**. 30: 1-18, 1979.

SHIMAZU, T. Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. **Diabetologia**. 20: 343-56, 1981.

SHIMAZU, T. Reciprocal innervation of the liver: its significance in metabolic control. In: Szabo, A. J. (ed.) *Advances in Metabolic Disorders. CNS regulation of carbohydrate metabolism*. New York: Academic Press. 355-384, 1983.

SMRITI I., HELEN S.K. e PAUL L.W. Kappa opiate agonists modulate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 238 (2): 429-436, 1986.

SMYTH D.G. e ZAKARIAN S. Alpha, N-acetyl derivatives of beta-endorphin in rat pituitary: chromatographic evidence for processed forms of beta-endorphin in pancreas and brain. **Life Science**. 31(16-17):1887-1890, 1982.

SMYTHE, G.A.; PASCOE, W.S. e STORLIEN, L.H. Hypothalamic noradrenergic and sympathoadrenal control of glycemia after stress. **American Journal of Physiology**. 256: 231-35, 1989.

STERN A.S. et al. Opioid polypeptides in guinea pig pancreas. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 79: 6703-6707, 1982.

SUH H.W. et al. Involvement of dynorphin in immobilization stress-induced antinociception in the mouse. **European Neuropsychopharmacology**. 10: 407-413, 2000.

VACCARINO A.L. e KASTIN A.J. Endogenous opiates: 2000. **Peptides**. 22: 2257-2328, 2001.

VAN LOON G.R. e APPEL N.M. Plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine responses to intracerebral administration of met-enkephalin analog, D-ala2-met-enkephalinamide, in rat. **Neuroendocrinology**. 33 (3): 153-157, 1981.

VAN LOON G.R., APPEL N.M. e HO D. Beta-endorphin-induced stimulation of central sympathetic outflow: beta-endorphin increases plasma concentrations of epinephrine, norepinephrine and dopamine in rats. **Endocrinology**. 109 (1): 46-53, 1981.

VAN LOON G.R., APPEL N.M. e HO D. Beta-endorphin-induced increases in plasma epinephrine, norepinephrine and dopamine in rats: inhibition of adrenomedullary response by intracerebral somatostatin. **Brain Research**. 212 (1): 207-214, 1981.

VAN LOON G.R. e APPEL N.M. Beta-endorphin-induced hyperglycemia is mediated by increased central sympathetic outflow to adrenal medulla. **Brain Research**. 204 (1): 236-241, 1981.

WANG W. et al. Studies on mu and delta opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 92: 12436- 12440; 1995.

WATSON S. et al. Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. **Science**. 218: 1134-1136, 1982.

WONG SC YEUNG DC. Effect of morphine on gluconeogenesis and ureogenesis in rat liver. **International Journal Biochemistry**. 13 (3): 323-327, 1981.

XUE J. et al. Differential binding domains of peptide and non-peptide ligands in the cloned rat kappa opioid receptor. **Journal of Neurochemistry**. 269: 30195-30199; 1994.

YUAN C.S. et al. Effects of enteric-coated methylnaltrexone in preventing opioid-induced delay in oral-cecal transit time. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. 67: 398-404, 2000.

ZADINA J.E. et al. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opioid receptor. **Nature** 386: 499-502, 1997.

ZAKARIAN S. e SMYTH D.G. Distribution of β -endorphin-related peptides in rat pituitary and brain. **The Biochemical Journal**. 202: 561-571, 1982.

ZAMIR N., PALKOVITS M. e BROWNSTEIN M. Distribution of immunoreactive dynorphin in the central nervous system of the rat. **Brain Research**. 280: 81-93, 1983.

ZUKIN R.S. et al. Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**. 85: 4061-4065, 1988.