

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA e FARMACOLOGIA**

**Caracterização do Perfil Glicêmico e Lipídico de
Camundongos C57BL/6 Knockout para o
Receptor MAS de Angiotensina-(1-7)**

Janaína Félix Braga

**Belo Horizonte
Agosto – 2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA e FARMACOLOGIA**

Caracterização do Perfil Glicêmico e Lipídico de Camundongos C57BL/6 Knockout para o Receptor MAS de Angiotensina-(1-7)

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

**Belo Horizonte
Agosto – 2009**

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por estar sempre presente em minha vida, me abençoando e me guiando.

Ao meu amado Rodrigo,

Pela força, imenso carinho e compreensão. Obrigada pela paciência, apoio e respeito. O seu amor é e sempre será importante para mim.

Aos meus queridos pais e irmãos,

Aos meus pais pelo exemplo de vida, por acreditarem em mim e me proporcionarem mais esta vitória. Eu não chegaria tão longe sem o apoio deles.

Aos meus irmãos pela paciência, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador Prof. Robson, os meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada por acreditar em mim. Sua confiança e orientação foram essenciais para chegar até aqui.

À Prof^a. Leida, pelos ensinamentos.

As minhas amigas Renatinha, Soninha e Beth. Muito obrigada pela lealdade, cumplicidade e respeito. Companheiras para todas as horas.

Aos amigos e professores do laboratório de Hipertensão, pela convivência e pelo aprendizado diário, em especial: Aline, Serginho, Gigi, Flavinha, Nívia, Priscila, Érika, Laura, Augusto, Marcelo, Roberto, Antonela, Jousie, Michelle, Analina, Carlos, Elizandra, Silvinha.

À Marilene e ao Zezé, por estarem sempre disponíveis em todos os momentos necessários.

À Renatinha pela ajuda com o RT-PCR.

Ao Kinulpe pela ajuda com a imunohistoquímica.

À Hilma pelo cuidado e ajuda com os animais.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia.

A toda minha família, pela força e pelos bons momentos que sempre passamos juntos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O Sistema Renina-Angiotensina	17
1.2. Angiotensina II.....	19
1.3. Angiotensina-(1-7).....	21
1.4. Camundongo Knockout para o Receptor Mas de Angiotensina-(1-7).....	24
1.5. Relação entre Distúrbios Metabólicos e o Sistema Renina-Angiotensina	26
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Animais.....	35
3.2.1. Ingestão Alimentar.....	35
3.2.2. Peso Corporal e do Tecido Adiposo	36
3.2.3. Medida da Pressão Arterial Sistólica	36
3.2.4. Teste de Tolerância à Glicose e Sensibilidade à Insulina	37
3.2.5. Amostra de Sangue	37
3.2.6. Coleta de Tecidos.....	38
3.2.7. Determinação dos Níveis Séricos de Insulina.....	38
3.2.8. Determinação dos Níveis Séricos de Colesterol Total	38

3.2.9. Determinação dos Níveis Séricos de Triglicerídeos	39
3.2.10. Determinação dos Níveis de Ácidos Graxos Livres	39
3.2.11. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT)	39
3.2.11.1. Extração de RNA Total.....	39
3.2.11.2. Tratamento do RNA com DNAase	40
3.2.11.3. Quantificação do RNA Total	40
3.2.11.4. RT (Transcrição Reversa)	40
3.2.11.5. PCR Quantitativa	41
3.2.12. Análise Semi-Quantitativa da Proteína GLUT-4	43
3.2.12.1. Extração de Proteínas Totais.....	43
3.2.12.2. Western Blotting	43
3.2.13. Imunohistoquímica	45
3.2.13.1. Processamento do Material para Análise	45
3.2.13.2. Técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase	46
3.2.13.3. Protocolo de Imunohistoquímica	47
3.3. Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Avaliação do Peso Corporal e da Ingestão Alimentar	51
4.2. Avaliação do Peso do Tecido Adiposo Epididimal e Retroperitoneal	53
4.3. Avaliação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)	55
4.4. Avaliação do Perfil Glicêmico.....	56
4.5. Avaliação dos Níveis Séricos de Insulina	58
4.6. Quantificação das Células- α das Ilhotas de Langerhans Produtoras de Glucagon	59
4.7. Avaliação do Perfil Lipídico	61
4.8. Expressão da Proteína GLUT-4 no Tecido Adiposo Epididimal.....	63

4.9. Expressão Gênica do Angiotensinogênio, Receptor AT ₁ , TNF- α , TGB- β e Receptor de Insulina no Tecido Adiposo Epididimal	64
5. DISCUSSÃO	67
6. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

O sistema renina-angiotensina é responsável por regular as funções renais e cardiovasculares. Além disso, está envolvido em diversas funções no organismo, como na regulação do metabolismo glicêmico e lipídico.

Todos os componentes deste sistema estão presentes no tecido adiposo, sendo que o peptídeo vasoconstritor, Angiotensina II, está envolvido no desenvolvimento da resistência à insulina e dislipidemia. Recentemente, estudo realizado em camundongos FVB/N knockout para o receptor Mas, foi observado que a deleção genética desse receptor produziu profundas alterações do metabolismo glicêmico e lipídico. Esses animais apresentaram aumento da massa adiposa, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial, caracterizando-os como modelo de Síndrome Metabólica. Somando-se a isso, sabe-se que a severidade dos distúrbios metabólicos é grandemente influenciada pelo background genético.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel do receptor Mas na regulação do metabolismo glicêmico e lipídico de camundongos C57BL/6 knockout para este receptor (KO-Mas). Para isso foram utilizados animais KO-Mas e seu controle WT com aproximadamente 10 semanas de idade. Os valores da pressão arterial (pletismografia de cauda), peso corporal e ingestão alimentar foram mensurados assim que iniciaram os experimentos. Em adição foi realizado o teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Após anestesia intraperitoneal de ketamia/xilasina e, com os animais em jejum, os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal foram coletados e pesados para posterior análise. O tecido adiposo epididimal foi usado para avaliar a expressão do *mRNA* para o angiotensinogênio (AOG), receptor AT₁, TGF- β , TNF- α e receptor de insulina e, para a expressão protéica do GLUT-4. Foram mensurados os níveis séricos de colesterol total e triglicérides e, ácidos graxos livres. E por fim, foi feita análise quantitativa das células- α das ilhotas de Langerhans produtoras de glucagon. Esses animais apresentaram redução significativa do peso corporal e da massa adiposa epididimal e retroperitoneal, porém associados a uma maior ingestão alimentar ($p < 0,05$). Além disso, os camundongos KO-Mas apresentaram aumento significativo da sensibilidade dos tecidos periféricos à ação da insulina ($p < 0,0001$), do número de células- α produtoras de glucagon ($p < 0,001$) e, da expressão gênica para o receptor AT₁ ($p < 0,05$) e TGF- β ($p < 0,05$). Os níveis

séricos de insulina apresentaram apenas uma tendência de redução, mas esse dado não foi significativo. Por outro lado, não foram observadas alterações nos níveis pressóricos, nos níveis glicêmicos durante o teste de tolerância à glicose e nem no perfil lipídico. Da mesma forma, a expressão gênica para o AOG, TNF- α e receptor de insulina e, a expressão protéica para o GLUT-4 não diferiram entre os animais KO-Mas e seu controle WT. Os resultados obtidos no presente estudo mostram pela primeira vez que o efeito do eixo Ang-(1-7)/Mas no controle do metabolismo glicêmico e lipídico é altamente dependente do background genético estudado. Além disso, mostramos a importância das alterações genéticas no desenvolvimento de várias doenças metabólicas e cardiovasculares.

ABSTRACT

The renin-angiotensin system is responsible for regulating cardiovascular and renal function. It is also involved in various functions in the body, as in the regulation of glucose and lipid metabolism. The components of the renin-angiotensin system (RAS) are fully represented in the adipose tissue and its vasoconstrictor peptide Ang II is involved in adipocyte differentiation and in body fat accumulation. Recently, we have shown that Mas knockout male mice (Mas-KO), in the pure FVBN genetic background, presents obesity, dyslipidemia, insulin resistance and hypertension. These features mimetizes the metabolic syndrome. Furthermore, the severity of metabolic parameters are strongly affected by the genetic background. Therefore, the aim of this study is to investigate the glycemic and lipid profile on C57BL/6 Mas-KO mice. Ten weeks old Mas-KO and WT male mice were used. Values of blood pressure (tail cuff plethysmography), body weight and food intake were measured. In addition, the glucose tolerance and insulin sensitivity tests were performed. After anesthesia by intraperitoneal ketamin/xylasin administration, and with animals in fasted, epididymal and retroperitoneal adipose tissues were collected and weighted. The epididymal adipose tissue was used to analyze the gene expression for angiotensinogen (AGT), AT₁ receptor, TGF- β , TNF- α and insulin receptor and, the protein expression for GLUT-4. Serum was analyzed for total cholesterol, tryglicerides, free-fat acids and insulin. At last, pancreatic α cells producing glucagon were analyzed by immunohistochemistry. These animals presented a significant reduction of both body weight and epididymal and retroperitoneal adipose tissue which were associated with an increase of food intake when compared to controls ($p < 0,05$). Moreover Mas-KO mice showed significant increase on insulin sensitivity ($p < 0,0001$), on α cells number ($p < 0,001$) and TGF- β expression ($p < 0,05$). On the other hand, there were no alterations on BP values, fast glycemia, glucose overload test, insulin serum levels and lipid profile. In the same way, expression of AGT, TNF- α , insulin receptor and GLUT-4 did not differ between Mas deficient mice and controls. Whereas, the deletion of the gene that encodes Mas in FVB/N mice results in more pronounced changes and even opposite, our results showed for the first time that the involvement of Ang-(1-7)/Mas axis in metabolism is background dependent.

LISTA DE ABREVIATURAS

A-779 – antagonista específico do receptor Mas

AGL – ácidos graxos livres

AGT – angiotensinogênio

AMP – aminopeptidase

Ang I – angiotensina I

Ang II – angiotensina II

Ang III – angiotensina III

Ang IV – angiotensina IV

Ang-(1-5) – angiotensina-(1-5)

Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) – angiotensina-(1-9)

AT1 – receptor tipo 1 de angiotensina

AT2 – receptor tipo 2 de angiotensina

CBP – carboxipeptidase

DAB – 3,3 tetraidrocloro de diaminabenzidina

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECA2 – enzima conversora 2 de angiotensina

FAS – ácido graxo sintetase

GLUT-4 – transportador de glicose-4

GPDH – glicerol-3-fosfato desidrogenase

HDLc – lipoproteína de alta densidade

IL-6 – interleucina-6

IRS-1 – substrato do receptor de insulina-1

KO-Mas – knockout para o receptor Mas

LDLc – lipoproteína de baixa densidade

MAP-K –

Mas – receptor Mas de angiotensina-(1-7)

mRNA – RNA mensageiro

NEP – endopeptidase neutra

NO – óxido nítrico

PAI-1 – inibidor do ativador do plasminogênio

PEP – prolil endopeptidase

PI3-K – fosfatidilinositol-3-quinase

RNA – ácido ribonucléico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SRA – sistema renina-angiotensina

TGF- β – fator de necrose tecidual- β

TGL – triglicérides

TNF- α – fator de necrose tumoral- α

VLDL – lipoproteína de muita baixa densidade

PAS – pressão arterial sistólica

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Esquema simplificado da formação e degradação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina.

Figura 2: Peso Corporal, expresso em gramas, em camundongos C57BL/6 WT (n=16) e KO-Mas (n=16). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 3: Ingestão alimentar em camundongos C57BL/6 WT (n=16) e KO-Mas (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 4: Peso do tecido adiposo epididimal, expresso em gramas, em camundongos C57BL/6 WT (n=16) e KO-Mas (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 5: Peso do tecido adiposo retroperitoneal, expresso em gramas, em camundongos C57BL/6 WT (n=15) e KO-Mas (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 6: Valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS), expressos em mmHg obtidos por pletismografia de cauda, em camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=6).

Figura 7: Níveis glicêmicos, expressos em mg/dl, durante o teste de tolerância à glicose em camundongos C57BL/6 WT (n=15) e KO-Mas (n=17).

Figura 8: Níveis glicêmicos, expressos em mg/dl, durante o teste de sensibilidade à insulina em camundongos C57BL/6 WT (n=17) e KO-Mas (n=17). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste two-away Anova, seguido de post-test de Bonferroni).

Figura 9: Níveis séricos de insulina, expressos em ng/ml, em camundongos C57BL/6 WT (n=8) e KO-Mas (n=8).

Figura 10: Número de células- α das ilhotas de Langerhans, localizadas na cauda pancreática (junto ao baço), expresso em porcentagem, nos camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=9). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 11: Total de células por ilhota de Langerhans, localizadas na cauda pancreática (junto ao baço), nos camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=9).

Figura 12: Figura representativa das ilhotas de Langerhans de animais WT. Células- α , produtoras de glucagon, marcadas em marrom.

Figura 13: Figura representativa das ilhotas de Langerhans de animais KO-Mas. Células- α , produtoras de glucagon, marcadas em marrom.

Figura 14: Níveis séricos de colesterol total, expressos em mg/dL, em camundongos C57BL/6 WT (n=9) e KO-Mas (n=9) nos animais WT e KO-Mas.

Figura 15: Níveis séricos de triglicérides, expressos em mg/dL, em camundongos C57BL/6 WT (n=7) e KO-Mas (n=8).

Figura 16: Níveis de ácidos graxos livres, expressos em mmol/l, em camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=6).

Figura 17: Expressão da proteína GLUT-4, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=4) e KO-Mas (n=4).

Figura 18: Expressão do *mRNA* para o angiotensinogênio, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=4).

Figura 19: Expressão do *mRNA* para o receptor AT_1 , no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=7) e KO-Mas (n=7) . * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 20: Expressão do *mRNA* para TGF- β , no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=4) . * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 21: Expressão do *mRNA* para o TNF- α , no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=7) . * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Figura 22: Expressão do *mRNA* para o receptor de insulina, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=7) . * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

Tabela 1: Especificação dos primers utilizados.

1. INTRODUÇÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é reconhecido como um sistema hormonal circulante e local responsável por regular as funções renais e cardiovasculares, exercendo papel central na homeostasia da pressão arterial e no balanço hidroeletrolítico. Além disso, está envolvido em diversas funções no organismo, como na regulação do metabolismo glicêmico e lipídico (Gross e cols., 1964; Ferrario e cols., 1998; Santos e cols., 2008).

Classicamente, a Angiotensina II (Ang II) é considerada o principal peptídeo biologicamente ativo deste sistema, cujas ações são mediadas via receptores tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) de Angiotensina (Timmermans e cols., 1993; Batenburg e cols., 2004). Porém a grande maioria de suas ações ocorre via receptor AT₁ resultando, dentre outros efeitos, em vasoconstrição e proliferação celular (Zhou e cols., 2003; Touyz e cols., 2005). Além disso, já está bem descrito na literatura que este peptídeo tem papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina e dislipidemia (Ran e cols., 2004; Wei e cols., 2006).

A descoberta de outro peptídeo biologicamente ativo, a Angiotensina-(1-7) [(Ang-(1-7))] (Santos e cols., 1988), trouxe novas perspectivas de estudo para este sistema, já que a maioria de suas ações opõe àquelas mediadas pela Ang II via receptor AT₁ (Santos e cols., 2008). Somando-se a isto, os avanços das técnicas de biologia molecular e celular possibilitaram a identificação de outros componentes do SRA, como o receptor para a Ang-(1-7), codificado pelo protooncogene *Mas* (Santos e cols., 2003) e a Enzima Conversora 2 de Angiotensina (ECA2) (Donoghue e cols., 2000), principal enzima responsável pela formação da Ang-(1-7) a partir da Ang II.

Hoje, sabe-se que a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/*Mas* resulta em ações contra-regulatórias àquelas exercidas pela Ang II, como vasodilatação (Almeida e cols., 2000; Sampaio

e cols., 2007), inibição da proliferação celular (Tallant e cols., 2003) e efeito protetor no desenvolvimento da resistência à insulina e dislipidemia (Santos e cols., 2008; Giani e cols., 2009)

Assim, o SRA apresenta dois braços contra-regulatórios: um representado pela Ang II/receptor AT₁ e outro representado pela Ang-(1-7)/Mas. Situações que resultam em aumento da atividade e expressão dos componentes deste sistema associados à ausência de equilíbrio entre os dois eixos contra-regulatórios contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (Griendling e cols., 1993; Touyz e cols., 2005; Santos e cols., 2008).

Dessa forma, no presente estudo avaliamos o papel do eixo Ang-(1-7)/Mas no controle do metabolismo glicêmico e lipídico em camundongos C57BL/6 knockout para o receptor Mas (KO-Mas) de Ang-(1-7).

1.1. O Sistema Renina-Angiotensina

Classicamente, a ativação do SRA se inicia pela enzima renina, uma aspartil protease sintetizada e liberada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. Esta, por sua vez, cliva o angiotensinogênio (AGT), uma α_2 globulina, formando um decapeptídeo inativo, a Angiotensina I (Ang I) (Griendling e cols., 1993). Grande parte do AGT circulante provém do fígado. No entanto, estudos recentes têm identificado a presença do SRA nos vasos (Santos e cols., 2000), rins (Miyata e cols., 1999), coração (Jurkovicová e cols., 2001), pâncreas (Lau e cols., 2004) e tecido adiposo (Cassis e cols., 2008), locais onde os componentes deste sistema também podem ser sintetizados.

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), outro componente do SRA, é uma dipepidil carboxipeptidase presente na superfície luminal do endotélio vascular contendo dois domínios ativos, os quais são inibidos pelos inibidores da ECA (Fucks e cols., 2008). Ela é responsável por catalisar a remoção dos dois aminoácidos da porção amino-terminal (Histidina-Leucina) da Ang I dando origem a um octapeptídeo biologicamente ativo, a Ang II (Donoghue e cols., 2000). Além disso, essa enzima hidrolisa a bradicinina e o heptapeptídeo Ang-(1-7) em metabólitos inativos (Chappell e cols., 1998; Donoghue e cols., 2000). Assim, essa enzima participa do controle cardiovascular por degradar peptídeos vasodilatadores e contribuir para a formação da Ang II.

A Ang II também pode ser formada por outras vias alternativas como pela ação de quimases (Urata e cols., 1996; Fucks e cols., 2008) e, também pode ser diretamente formada a partir do AGT pela ação da tonina e/ou da catepsina G (Grisé e cols., 1981; Santos e cols., 2005). Isso sugere que a inibição da produção da Ang II não ocorre apenas pela inibição da ECA, já que existem outras enzimas envolvidas em sua formação.

Tanto a Ang I quanto a Ang II podem ser hidrolisadas, pela ECA 2 formado a Ang-(1-7) (Ferrario e cols., 2006; Keidar e cols., 2006). No entanto, a atividade catalítica da ECA2 para hidrolisar a Ang II é 400 vezes maior do que para a Ang I (Vickers e cols., 2002). A Ang-(1-7) também pode ser formada pela ação de outras endopeptidases e carboxipeptidases.

A ECA 2, uma enzima homóloga a ECA, é uma carboxipeptidase recentemente identificada, que difere da ECA por não ser inibida por inibidores da enzima conversora de angiotensina. Ela está expressa em vários tecidos incluindo as células endoteliais vasculares dos rins, coração e testículos. (Tipins e cols., 2000; Danilczyk e cols., 2006). Esta enzima, ao hidrolisar a Ang I, remove um único resíduo C-terminal (Leucina), para formar um peptídeo

inativo, a Angiotensina-(1-9) [(Ang-(1-9))] (Donoghue e cols., 2000). Este pode ser convertido em Ang-(1-7), um componente biologicamente ativo do SRA, por ação da ECA e de outras endopeptidases. Além disso, a ECA 2 hidrolisa a Ang II gerando diretamente a Ang-(1-7) (Ferrario e cols., 2006). Assim, sugere-se que a ECA 2 pode modular o SRA contrabalançando as ações vasoconstritoras e proliferativas da Ang II (Burrell e cols., 2004; Santos e cols., 2008).

A figura 1 ilustra de forma simplificada as vias de formação e degradação dos peptídeos do SRA (Santos e cols., 2008).

1.2. Angiotensina II

A Ang II, antes descrita como hipertensina ou angiotonina foi reconhecida como um agente pressor em 1956 (Lentz e cols.), por causar vasoconstrição e elevação da pressão arterial. Hoje, sabe-se que a Ang II é o principal peptídeo ativo do SRA por exercer importante papel na homeostasia cardiovascular e renal. No entanto, outros estudos mostram que este peptídeo também está envolvido na fisiopatologia de várias doenças (Kim e cols., 2000; Ran e cols., 2004; Wei e cols., 2006).

A Ang II age em dois receptores distintos, AT₁ e AT₂, ambos acoplados a proteína G e com sete domínios transmembrana (Zhou e cols., 2003; Batenburg e cols., 2004). Porém a maioria de suas ações hemodinâmicas é exercida através da interação com receptores AT₁ (Zhou e cols., 2003; Touyz e cols., 2005) os quais estão presentes no coração, cérebro, pulmões, vasos sanguíneos e rins (Timmermans e cols., 1993). Os efeitos da Ang II mediados via receptor AT₁ incluem aumento da pressão arterial local e sistêmica devido ao seu efeito vasoconstritor e proliferativo, estimulação da reabsorção renal de sódio tanto diretamente quanto via liberação de

aldosterona, aumento da ingestão de sal, sede e aumento da atividade nervosa simpática (Timmermans e cols., 1993; DeGasparo e cols., 2000). Além disso, a Ang II induz resposta inflamatória na parede vascular, trombose e remodelamento da matrix extracelular (Prasad e cols., 2004; Touyz e cols., 2005; Cheng e cols., 2005).

Já as ações da Ang II via receptor AT_2 são pouco estudadas, porém, em geral, seus efeitos são opostos àqueles exercidos via receptor AT_1 . Os receptores AT_2 estão presentes principalmente durante o desenvolvimento fetal (Grady e cols., 1991) e seus níveis diminuem marcadamente na idade adulta, sugerindo possível papel deste receptor no crescimento e desenvolvimento embrionário. Assim, os efeitos da Ang II via receptor AT_2 pode produzir resposta vasodilatadora dependente da ativação de receptores tipo 2 de bradicinina (B_2) e liberação de NO em microartérias coronárias humanas (Batenburg e cols., 2004) e, em ratos (Carey e cols., 2001). Além disso, está envolvido em ações antiproliferativas, apoptose, diferenciação celular (Gallinat e cols., 2000) e proteção contra resposta inflamatória (Wu e cols., 2001).

Uma vez sendo formada a Ang II, esta pode ser degradada em fragmentos biologicamente ativos: a Angiotensina III (Ang III) que também interage com o receptor AT_1 , porém é menos potente que a Ang II; Angiotensina IV (Ang IV) que causa vasodilatação e natriurese; e a Ang-(1-7) (Handa e cols., 2001).

1.3. Angiotensina-(1-7)

Santos e colaboradores, em 1988, observaram pela primeira vez a formação de Ang-(1-7) em homogenato de cérebro de cães e, mostraram que este peptídeo era produto da Ang I em presença ou ausência de inibidores da ECA. Porém, suas ações fisiológicas começaram a ser demonstradas em estudos posteriores, quando Schiavone e colaboradores (1988) descreveram que a Ang-(1-7) foi equípote a Ang II em liberar vasopressina a partir de *explants* neurohipofisais *in vitro*. Somando-se a isso, Campagnole-Santos e cols. (1989) observaram a redução da pressão arterial a partir de microinjeções de baixas doses de Ang-(1-7) no Núcleo do Trato Solitário. Desde então vários trabalhos foram desenvolvidos demonstrando que esse heptapeptídeo é um membro ativo do SRA (Santos e cols., 2008).

A Ang-(1-7) está presente na circulação e em alguns tecidos incluindo coração, vasos sanguíneos e rins (Santos e cols., 2005). Em 2003, Santos e cols. descreveram o Mas, um receptor acoplado a proteína G com sete domínios transmembrana, como o receptor funcional desse heptapeptídeo. Eles observaram que a deleção genética deste receptor aboliu a ligação da Ang-(1-7) em rins de camundongos da linhagem C57BL/6, além de abolir sua ação antidiurética após sobrecarga hídrica. Somando-se a isso, aorta de camundongos KO-Mas perdeu sua resposta vasodilatadora, induzida pela Ang-(1-7).

A Ang-(1-7) via Mas produz vasodilatação mediada pela produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (Heisch e cols., 2001; Santos e cols., 2000) reduzindo a pressão arterial e melhorando a função endotelial (Faria-Silva e cols., 2005). Além disso, ela potencializa as ações da bradicinina (Almeida e cols., 2000), apresenta efeito antitrombótico (Fraga-Silva e cols.,

2008) e anti-arritmogênico (Ferreira e cols., 2001), inibe o crescimento e proliferação celular (Tallant e cols., 2003) e, a liberação de norepinefrina (Gironacci e cols., 2004).

Centralmente a Ang-(1-7) modula o controle tônico e reflexo da pressão arterial, aumentando a sensibilidade do reflexo baroreceptor (Campagnole-Santos e cols., 1992). Já em relação à função renal, a Ang-(1-7) aumenta o fluxo sanguíneo em ratos anestesiados (Sampaio e cols., 2003), produz vasodilatação das arteríolas aferentes através da liberação de NO (Ren e cols., 2002), além de apresentar efeitos antidiuréticos em ratos com sobrecarga hídrica (Santos e cols., 1996). Assim, geralmente seus efeitos são opostos àqueles mediados pela Ang II via receptor AT_1 , sendo considerado um peptídeo contra-regulador do SRA.

Portanto, a nova visão do SRA apresenta um sistema com dois eixos contra-regulatórios: um vasoconstritor/proliferativo onde o principal efetor é a Ang II agindo via receptor AT_1 e outro vasodilatador/antiproliferativo sendo o principal efetor a Ang-(1-7) via receptor Mas (Timmermans e cols., 1993; Heisch e cols., 2001; Tallant e cols., 2003; Santos e cols., 2008). Desequilíbrios na interação harmônica entre Ang II e Ang-(1-7) podem contribuir para o início e desenvolvimento de patologias.

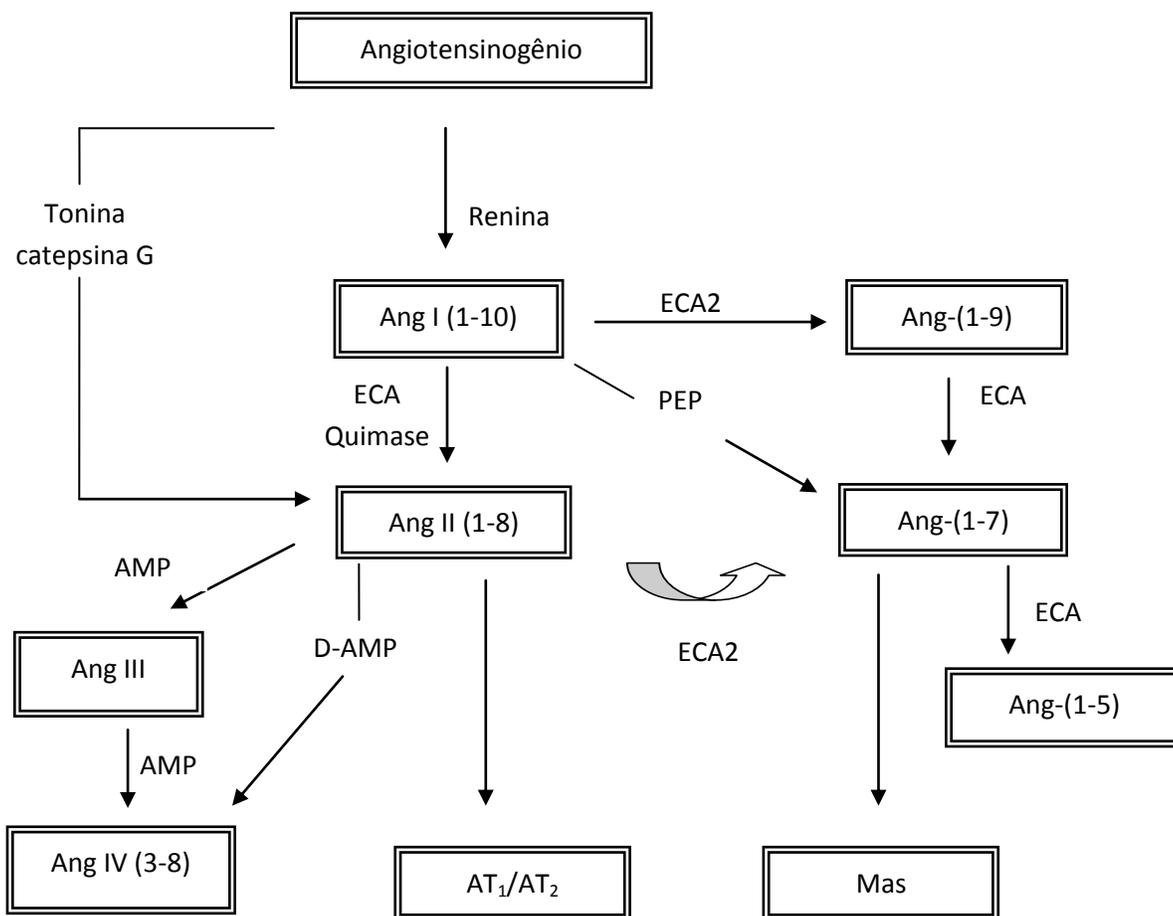


Figura 1. Esquema simplificado da formação e degradação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina. Ang = Angiotensina; ECA = enzima conversora de Angiotensina; ECA2 = enzima conversora 2 de Angiotensina; AMP = aminopeptidase; CBP = carboxipeptidase; NEP = endopeptidase neutra; PEP = prolil endopeptidase; AT₁ = receptor tipo 1 de Ang II; AT₂ = receptor tipo II de Ang II; Mas = Receptor Mas de Ang-(1-7). Modificado de Santos e cols., 2008.

1.4. Camundongo Knockout para o Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)

O gene do Mas foi descoberto em 1986 (Yound e col., 1986) e originalmente descrito como um protooncogene. Ele codifica um receptor acoplado à proteína G com sete domínios transmembrana, que antes era considerado como um receptor “órfão”. Hoje, sabe-se que a angiotensina-(1-7) é um ligante endógeno para este receptor (Santos e cols., 2003).

O desenvolvimento de animais transgênicos com alterações nos componentes do SRA, como a deleção genética do protooncogene Mas (Walther e cols., 1998), possibilitou avaliar a importância funcional desse sistema na fisiopatologia cardiovascular e nos distúrbios metabólicos (Castro e cols., 2006; Santos e cols., 2008).

O camundongo com deleção do protooncogene *Mas* (KO-Mas) foi desenvolvido a partir do camundongo C57BL/6 por Walther e colaboradores em 1998. Eles observaram que estes animais são saudáveis e apresentam crescimento normal, sem alterações morfológicas no cérebro e na fertilidade. No entanto, potenciação hipocampal e ansiedade foram marcadamente afetadas pela mutação gênica.

Como o receptor Mas pode interagir com a sinalização da Ang II, o mesmo grupo (Walther e cols., 2000) demonstrou que nem a frequência cardíaca e nem a pressão arterial estavam alteradas nos animais KO-Mas quando comparados com o seu controle. Porém foi observada alteração significativa na variabilidade da frequência cardíaca e aumento do tônus simpático. De acordo com esses achados, Rabelo e colaboradores (2008) também não encontraram diferença significativa na pressão arterial dos camundongos KO-Mas da linhagem C57BL/6. No entanto foi observado disfunção endotelial e desbalanço entre a produção de NO e espécies reativas de oxigênio.

A deleção do protooncogene Mas também foi feita em camundongos da linhagem FVB/N e, Xu e colaboradores (2008) observaram que esta linhagem apresenta aumento significativo da pressão arterial além de disfunção endotelial, que apresentou mais acentuada do que nos camundongos KO-Mas da linhagem C57BL/6.

O eixo Ang-(1-7)/Mas também apresenta papel importante na manutenção da estrutura e função cardíaca. Castro e colaboradores (2006) observaram que coração isolado de camundongos C57BL/6 KO-Mas, apresentam aumento da pressão de perfusão coronária, baixa tensão sistólica, \pm dT/dt e frequência cardíaca. Em adição, Santos e colaboradores (2006) mostraram, além dessas alterações na função cardíaca, alta resistência dos vasos coronarianos, diminuição da fração de encurtamento, maior volume sistólico final no ventrículo esquerdo e alterações das proteínas da matrix extracelular.

Com relação ao papel do receptor Mas na regulação do metabolismo glicêmico e lipídico, recente trabalho de Santos e cols. (2008) observaram que o background FVB/N KO-Mas apresenta um estado metabólico semelhante ao encontrado em pacientes com síndrome metabólica como aumento da massa adiposa, resistência à insulina e dislipidemia.

Assim, a deleção genética do Mas induz importantes alterações cardiovasculares e metabólicas que poderiam ser explicadas pela ausência desse receptor; tornando o Mas e seu ligante funcional como alvos potenciais para o desenvolvimento de agentes cardioprotetores (Santos e cols., 2005).

1.5. Relação entre Distúrbios Metabólicos e o Sistema Renina-Angiotensina

Nos últimos anos, o tecido adiposo tem sido considerado como um órgão endócrino, expressando e secretando na circulação uma série de citocinas, hormônios, fatores de crescimento e outras substâncias bioativas, coletivamente chamadas de adipocitocinas. Elas agem de forma autócrina/parácrina e endócrina, com conseqüentes efeitos no metabolismo glicêmico e lipídico. Dentre essas adipocitocinas incluem a adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento tecidual- β (TGF- β), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), ácidos graxos livres (AGL) e AGT (Giacchetti e cols., 2005; Cassis e cols., 2008).

Outros componentes do SRA estão presentes no tecido adiposo e evidências sugerem que este sistema é totalmente funcional e pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade (Massiéra e cols., 2001). Alguns estudos mostram a relação direta entre obesidade e a expressão de AGT no tecido adiposo (Giacchetti e cols., 2002; Hainault e col., 2008). Adipócitos de ratos Zucker obesos (*fa/fa*), durante o desenvolvimento da obesidade, apresentaram aumento significativo tanto da expressão quanto da secreção de AGT. Além disso, o AGT secretado pelo tecido adiposo possui papel importante no desenvolvimento do próprio tecido adiposo, assim como da hipertensão arterial (Massiéra e cols., 2001). Como conseqüência da maior formação de AGT pelos adipócitos, há maior formação local de Ang II que apresenta, em roedores, um papel importante no crescimento dos adipócitos.

Somando-se ao AGT, outros componentes do SRA, como a ECA, renina e o receptor AT₁, estão presentes no tecido adiposo, e apresentam maior expressão na presença de obesidade (Giacchetti e cols., 2002; Engeli e cols., 2003).

A obesidade (Sharma e cols., 2005; Grundy e cols., 2004; Giacchetti e cols., 2005) tem papel central no desenvolvimento da hipertensão arterial e da resistência à insulina, com conseqüente redução da tolerância à glicose, podendo levar ao desenvolvimento do *Diabetes Mellitus* do tipo 2. Além disso, a obesidade e a resistência à insulina levam a um quadro de dislipidemia aterogênica (Ginsberg e cols., 2006), caracterizado por aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides (TGL) e lipoproteína de baixa densidade (LDLc) e, redução dos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDLc). Há também o risco de desenvolver disfunção endotelial que, somando-se a fatores inflamatórios e pró-trombóticos, como fibrinogênio e PAI-1, aumenta o risco de aterosclerose (Prasad e cols., 2004). A coexistência variável desse conjunto de fatores de riscos cardiovasculares é denominada de Síndrome Metabólica (SM) (Grundy e cols., 2004).

Vários fatores, como a ativação do SRA, são responsáveis tanto pelo desenvolvimento da obesidade como de várias alterações metabólicas desencadeadas por ela (Prasad e cols., 2004; Strazzullo e cols., 2004).

O papel da Ang II no metabolismo glicêmico e lipídico já está bem estabelecido na literatura, tendo efeito importante no desenvolvimento da resistência à insulina e dislipidemia. Porém o seu papel na diferenciação dos adipócitos ainda é controverso. Em roedores, a Ang II é vista como um fator trófico da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros. Ela aumenta a atividade e a expressão de duas enzimas responsáveis pela formação dos adipócitos: ácido graxo sintetase (FAS) e a glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), controlando a adiposidade através da síntese e armazenamento de lipídeos (Saint-Marc e cols., 2001). Além disso, a Ang II induz a síntese pelos adipócitos de prostaglandina I₂, um efector autócrino potente e específico da diferenciação dos adipócitos, tanto in vitro quanto in vivo, pelo menos em ratos

(Darimont e cols., 1994; Mazzolai e cols., 1998). Modelo animal com deleção genética da ECA, com redução de $\pm 70\%$ nos níveis plasmáticos e teciduais de Ang II, apresentou redução da massa adiposa e aumento do gasto energético (Jayasooriya e cols., 2008). Por outro lado, foi demonstrado que a infusão crônica de Ang II em ratos resultou em redução do peso corporal e da ingestão alimentar, provavelmente devido à maior liberação de norepinefrina, contribuindo para o aumento da atividade metabólica e do gasto energético (Cassis e cols., 1998).

Já camundongos com deleção específica dos receptores AT₁ (Kouyama e cols., 2005) e AT₂ (Yvan-Charvet e cols., 2005), foi observado uma massa adiposa similar ao controle, porém caracterizada por adipócitos menores e em maior número. Esses animais apresentaram uma maior capacidade de oxidação de lipídeos, e mostraram-se protegidos das ações deletérias da dieta rica em lipídeos, tanto em relação ao desenvolvimento de obesidade quanto de resistência à insulina. Estes dados sugerem que a sinalização da Ang II via receptores AT₁ e AT₂ promove ganho de peso e resistência à insulina observados na obesidade.

Em contraste, em humanos, a Ang II apresenta efeitos antiadipogênicos, que também poderia contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina. O tratamento de pré-adipócitos humanos com AGT e Ang II inibiu a adipogênese (Janke e cols., 2002), a qual foi estimulada por bloqueador do receptor AT₁ (Sharma e cols., 2002). Como hipótese, a Ang II secretada pelos adipócitos maduros inibiria o recrutamento dos pré-adipócitos limitando a capacidade do tecido adiposo em armazenar triglicérides. Isso resultaria na distribuição de gordura para outros órgãos como fígado e músculo esquelético. Essa deposição ectópica de gordura interferiria na sinalização insulínica levando a resistência à insulina (Sharma e cols., 2002).

A resistência à insulina é definida como a inabilidade da insulina em promover a homeostase dos níveis circulantes de glicose. (Carvalho-Filho e cols., 2007). Assim, para que a insulina tenha uma ação ótima, é necessária a presença de concentrações maiores do que o normal para manter a normoglicemia e a utilização de glicose pelos tecidos periféricos.

A insulina modula diversas funções metabólicas via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K)/Akt, como por exemplo, a captação de glicose, síntese de glicogênio, metabolismo de lipídeos e proteínas além de mediar efeitos vasodilatadores (por meio da síntese de NO) e antiinflamatórios via ativação da NO sintase (Wang e cols., 2004). Já a via da MAP quinase promove efeitos mitogênicos que levam ao crescimento e proliferação celular (Wang e cols., 2004; Carvalho-Filho e cols., 2007). Assim, a resistência à insulina é caracterizada por alteração na ativação da via PI3-K com preservação da sinalização da via MAP quinase, favorecendo as ações aterogênicas da insulina (Wang e cols., 2004; Carvalho-Filho e cols., 2007).

A interação entre a insulina e outros hormônios e peptídeos, tais como a Ang II, pode modular os efeitos finais da ação insulínica, já que as vias de sinalização intracelular da Ang II interagem com as vias de sinalização da insulina (Carvalho-Filho e cols., 2007).

Estudos mostram que a Ang II aumenta a fosforilação em serina da subunidade β do receptor de insulina, assim como do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1). Isso reduz ou bloqueia a translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4) dos compartimentos intracelulares para a membrana plasmática (Wei e cols., 2006) diminuindo a captação de glicose. A inibição da sinalização da insulina através da via da PI3-K possivelmente ocorre devido à ativação do receptor AT_1 (Wei e cols., 2006), resultando assim no desenvolvimento da resistência à insulina.

Além disso, a Ang II também estimula uma maior atividade da NAD(P)H oxidase, a qual gera espécies reativas de oxigênio (ROS) em uma variedade de células (Marrero e cols., 2004). A produção de ROS pela ativação da NAD(P)H oxidase tem sido fortemente associada com hipertensão arterial e resistência à insulina. Essa resistência à ação da insulina ocorre, pois as ROS prejudicam a fosforilação em tirosina dos IRS, impedindo a ativação da Akt e a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (Marrero e cols., 2004). Assim, enquanto a Ang II inibe as ações metabólicas da insulina via IRS/PI3-K/Akt, ela potencia os efeitos proliferativos da insulina via ERK1-2/MAP-quinase (Prasad e cols., 2004).

Como consequência do quadro de resistência à insulina há diminuição da captação e aumento da liberação de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo, os quais são convertidos no fígado em triglicérides sendo liberados na circulação na forma de lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL). Essa hipertrigliceridemia resulta na formação de LDL pequena e densa, que possui potente efeito aterogênico, por ser facilmente oxidável, e aumento do clearance de HDL (Prasad e cols., 2004). Não só a resistência à insulina, mas também a ativação do eixo Ang II/receptor AT₁ tem papel importante no desenvolvimento da dislipidemia, já que o tratamento de ratos obesos com bloqueadores do receptor AT₁ reduziu os níveis plasmáticos de triglicérides e ácidos graxos livres (Mizuno e cols., 2002; Ran e cols., 2004).

Além da Ang II alterar o metabolismo glicêmico levando a resistência à insulina, este peptídeo tem papel importante na regulação da secreção de insulina pelas células β da ilhota pancreática. A liberação de insulina estimulada por glicose foi reduzida de forma dose-dependente pela adição de Ang II em ilhotas isoladas de camundongos da linhagem C57BL/6. O pré-tratamento das ilhotas com losartan restaurou completamente a secreção de insulina pelas células- β pancreática (Lau e cols., 2004).

Assim, o aumento da atividade do SRA, principalmente do eixo Ang II/AT₁ pode ter efeitos deletérios locais e sistêmicos, contribuindo para a resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia e disfunção endotelial (Prasad e cols., 2004).

Como dito anteriormente, a Ang-(1-7) exerce importante papel contra-regulatório dentro do SRA, já que a maioria de seus efeitos é oposta àqueles mediados pelo eixo Ang II/AT₁. Porém há poucos dados na literatura referentes às ações da Ang-(1-7) no metabolismo glicêmico e lipídico (Santos e cols., 2008; Giani e cols., 2009).

Giani e colaboradores (2007) demonstraram que em coração de ratos in vivo a Ang-(1-7) estimulou a fosforilação em tirosina da Jak2 e do IRS-1, sendo esse efeito bloqueado pela administração de losartan. Além disso, a Ang-(1-7) estimulou a fosforilação da Akt, que foi bloqueada em presença de A-779, antagonista específico do receptor Mas. Isso resulta em maior translocação do transportador de glicose dos compartimentos intracelulares para a membrana plasmática aumentando a captação de glicose pelo coração. Trabalho publicado recentemente pelo mesmo grupo mostrou que o eixo Ang-(1-7)/Mas tem papel protetor no desenvolvimento da resistência à insulina (Giani e cols., 2009). Ratos Sprague-Dawley, tratados cronicamente com Ang-(1-7), apresentaram redução dos níveis plasmáticos de insulina e triglicérides, os quais apresentavam elevados após 6 semanas de frutose 10% na água de beber. Isso ocorreu, pois o heptapeptídeo Ang-(1-7) desviou a via de sinalização da insulina para IRS-1/PI3K/AKT no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, revertendo o estado de resistência à insulina. Dentro desse contexto, outro trabalho de nosso grupo, mostrou que ratos transgênicos TGR(A1-7)3292, caracterizados por elevação crônica (2-3 vezes) dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (TG-L3292), apresentaram redução do peso corporal, dos níveis de triglicérides e colesterol total, maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. O aumento da sensibilidade à insulina foi

associado ao aumento da AKT total e fosforilada no tecido adiposo epididimal (dados não publicados), indicando que o eixo Ang-(1-7)/Mas poderia participar do controle glicêmico.

Em recente trabalho de Santos e colaboradores (2008), a deleção genética do receptor Mas, em camundongos da linhagem FVB/N resultou em alterações profundas do metabolismo glicêmico e lipídico. Esses camundongos foram caracterizados como modelo de síndrome metabólica, por apresentarem aumento da massa adiposa, resistência à insulina e dislipidemia. Além disso, foi observado aumento da expressão do RNAm do AGT e redução da expressão protéica do GLUT-4 no tecido adiposo epididimal.

Somando-se aos efeitos deletérios (eixo Ang II/AT₁) e protetores (Ang-(1-7)/Mas) em resposta a ativação do SRA sistêmico e local, o background genético também influencia na severidade dos distúrbios metabólicos.

Em camundongos C57BL/6 ob/ob foi observado menor peso corporal, menor hiperglicemia e resistência muscular às ações da insulina quando comparado com o FVB/N, apresentando mesmo grau de obesidade e hiperinsulinemia (Haluzik e cols., 2004). Em modelo de lipoatrofia em camundongos A-ZIP/F-1, o background C57BL/6 produziu menor hiperglicemia e dislipidemia do que o background FVB/N, enquanto que a resistência insulínica e deposição de ácidos graxos no fígado apresentaram tendência oposta (Colombo e cols., 2003).

No entanto, não existe nenhum dado sobre a possível influência do eixo Ang-(1-7)/Mas no metabolismo lipídico e glicêmico de camundongos da linhagem C57BL/6 knockout para o receptor Mas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel do receptor Mas na regulação metabólica de camundongos C57BL/6 knockout para este receptor (KO-Mas).

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar em camundongos da linhagem C57BL/6 KO-Mas e em seus controles wild type (WT):

- 1- Possíveis alterações no peso corporal;
- 2- Os níveis de pressão arterial sistólica (PAS);
- 3- O perfil glicêmico;
- 4- O perfil lipídico dosando os níveis séricos de colesterol total, triglicérides e ácidos graxos livres;
- 5- A expressão da proteína GLUT-4 no tecido adiposo epididimal;

- 6- A expressão do *mRNA* para o angiotensinogênio, receptor AT₁, receptor de insulina, TGF- β e TNF- α no tecido adiposo epididimal;

- 7- A quantificação das células α das ilhotas de Langerhas produtoras de glucagon.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos C57BL/6 KO-Mas e seu controle WT com aproximadamente 10 semanas de idade. A matriz desse animal foi produzida no Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine (Berlin-Buch, Germany) (Walther e cols., 1998).

Todos os camundongos receberam dieta comercial, tiveram livre acesso à água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas individuais para a realização dos experimentos, com ciclo de luminosidade de 12 horas (07:00 às 19:00 h) e temperatura variando entre $25 \pm 2,0$ °C.

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (147/2008).

3.2. Procedimentos Experimentais

3.2.1. Ingestão Alimentar

A ingestão alimentar foi medida durante uma semana, com os animais sendo colocados em gaiolas individuais. Diariamente, no mesmo horário, o peso da comida foi mensurado em balança semi-analítica, subtraindo-se o valor obtido após 24 horas do peso inicial. A massa da comida ingerida diariamente foi corrigida pelo peso corporal.

3.2.2. Peso Corporal e do Tecido Adiposo

Para determinação do peso corporal, os animais com 10 semanas de idade foram pesados logo antes de iniciar os experimentos.

Para avaliação do peso do tecido adiposo os animais foram pesados e anestesiados com ketamina (130mg/kg) / xilasina (0,3mg/kg), com posterior sacrifício através de incisão na aorta abdominal. O tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foram retirados e pesados em seguida. O peso dos tecidos foi então corrigido pelo peso corporal.

3.2.3. Medida da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada indiretamente a partir da técnica de pletismografia de cauda. Antes da determinação da PAS, os animais eram aquecidos por um período de 5 minutos em uma manta aquecedora. Após esse procedimento era conectado à cauda do animal um sensor pneumático e um esfigmomanômetro e a medida da PAS era realizada. Os dados eram registrados e analisados a partir de um sistema de transdução *Windaq – Aquisition e Analysis System*. Pelo menos três medidas da pressão arterial foram obtidas por animal, em cada sessão.

3.2.4. Teste de Tolerância à Glicose e Sensibilidade à Insulina

Para avaliação do perfil glicêmico dos animais, foram realizados os testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.

Com os animais em jejum de 15 horas, o teste de tolerância à glicose foi realizado pela manhã, através da aplicação intraperitoneal de 2 g de glicose/kg de peso corporal. Com um pequeno corte na ponta da calda do animal, foi coletada uma gota de sangue para a verificação da glicemia no momento anterior à aplicação da glicose e com 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação. O aparelho utilizado para a leitura glicêmica foi o Accu-Chek® Advantage (Roche).

O teste de sensibilidade à insulina também foi realizado pela manhã, porém com os animais no estado alimentado, através da aplicação intraperitoneal de 0,75U de insulina/kg de peso corporal. Com um pequeno corte na ponta da calda do animal, foi coletada uma gota de sangue para a verificação da glicemia no momento anterior à aplicação de insulina e com 15, 30 e 60 minutos após a aplicação. O aparelho utilizado para a leitura glicêmica foi o Accu-Chek® Advantage (Roche).

3.2.5. Amostra de Sangue

Com os animais em jejum de 15 horas, amostras de sangue foram coletadas, por exanguinação da aorta abdominal, após aplicação de anestesia intraperitoneal de uma solução de ketamina (130mg/kg) e xilasina (0,3mg/kg). O soro foi separado por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243).

3.2.6. Coleta de Tecidos

Após pesagem, o tecido adiposo epididimal foi imediatamente congelado em gelo seco e estocado a -80°C. O tecido foi retirado do freezer somente para a realização da extração do *mRNA* e de proteínas. No intervalo de tempo entre a retirada dos tecidos e a extração, foram mantidos em gelo seco.

Foi retirada ainda um fragmento pancreático, junto ao baço (cauda pancreática), a qual foi lavada em PBS 1x e, imediatamente fixada em formol tamponado por 48hs. Este material foi incluído em paraplast® para a realização da imunohistoquímica.

3.2.7. Determinação dos Níveis Séricos de Insulina

Os níveis séricos de insulina foram medidos utilizando-se kit de Elisa da empresa Linco Research, St. Charles.

3.2.8. Determinação dos Níveis Séricos de Colesterol Total

Os níveis séricos de colesterol total foram quantificados utilizando-se kit enzimático comercial da empresa KATAL (Belo Horizonte, MG).

3.2.9. Determinação dos Níveis Séricos de Triglicerídeos

Os níveis séricos de triglicérides foram quantificados utilizando-se kit enzimático comercial KATAL (Belo Horizonte, MG).

3.2.10. Determinação dos Níveis de Ácidos Graxos Livres

Os níveis séricos de ácidos graxos livres foram medidos utilizando-se kit enzimático comercial da empresa WAKO (Pure Chemical Industries, Japan).

3.2.11. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT)

3.2.11.1. Extração de RNA Total

A extração de RNA total foi realizada pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio. O tecido adiposo epididimal foi homogeneizado em tubos plásticos contendo o reagente Trizol (50-100mg de tecido/1,0ml do reagente). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse procedimento foi adicionado 0,2ml de clorofórmio. Depois de serem agitados, os tubos foram deixados em repouso por 5 minutos a 4°C, sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. A camada superior foi recuperada com subsequente adição de 0,5ml de isopropanol, sendo deixado em repouso por 10 minutos a 4°C. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1ml de etanol 70% gelado, agitando novamente. Novamente o material

era centrifugado a 9.500 rpm por 5 minutos a 4°C e, o sobrenadante foi descartado. Após secagem em temperatura ambiente, o RNA foi novamente ressuscitado em água DEPEC.

3.2.11.2. Tratamento do RNA com DNAase

Para eliminação de uma possível contaminação com o DNA genômico, utilizou-se a enzima desoxiribonuclease I proveniente da empresa GibcoBRL®. O tratamento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

3.2.11.3. Quantificação do RNA Total

As amostras de RNA total foram diluídas 50 vezes e a concentração foi determinada em espectrofotômetro a 260nm. Para o cálculo da concentração do nucleotídeo, utilizou-se a seguinte equação: $[RNA_{total}] = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição}$, sendo o resultado expresso em µg/ml.

3.2.11.4. RT (Transcrição Reversa)

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA (DNA complementar), a qual foi realizada num volume final de reação de 30µL utilizando-se 1µg de RNA total, 0,2µg de hexadeoxinucleotídeos, tampão para a transcrição reversa (concentrações finais: Tris-HCl 45mM pH 8,3; LCl 68mM), 5µL de MgCl₂ 50mM, DTT 15mM, dNTPs 1,8mM e 150 UI de transcriptase reversa. O cDNA foi sintetizado em termociclador durante um período de 60

minutos de incubação a 37°C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 90 °C por 5 minutos.

3.2.11.5. PCR Quantitativa

As reações de PCR quantitativa foram feitas utilizando-se primers específicos para o cDNA do gene para o angiotensinogênio, receptor AT₁, TGB-β, TNF-α e receptor de insulina. A análise dos pares de bases foi executada através do programa específico BLASTN e sintetizados pela empresa Promega® (Tabela 1). Alíquotas na concentração de 200pmol/μl foram feitas e guardadas em freezer a -20°C. Uma subsequente diluição para 1pmol/μl foi necessária para o uso. Os primers do gene utilizado para normalização da reação (controle endógeno) foram de HPRT (Tabela 1).

O cDNA obtido da etapa de RT (2μl) foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR. As reações de PCR quantitativa foram feitas em duplicatas, utilizando-se 19μL do Máster Mix de SYBER Green, 2μL de cada primer na concentração de 1pmol/μl e 2μL de cDNA. O aparelho para reação foi o ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), sendo realizados 4 ciclos com temperatura de anelamento de 60 °C.

Tabela 1: Especificação dos Primers utilizados

Gene-alvo	Seqüência de nucleotídeo - Sense	Seqüência de nucleotídeo – Antisense
Angiotensinogênio	GAC GTG ACC CTG AGC AGT CC	TGA GTC CCG CTC GTA GAT GG
Receptor AT1	ATG GCT GGC ATT TTG TCT GG	GTT GAG TTG GTC TCA GAC AC
TNF- α	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC
TGF- β	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC	TGA CGA CGT CAC TGG AGT TGT AGG G
Receptor de Insulina	GAA TGT GAC AGC CAC CAC AC	CAG TGA AGT GTC TCA GGC CA
HPRT	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT	GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C

A análise da expressão dos genes foi semi-quantitativa (método delta CT) segundo modelo matemático desenvolvido por Ptaffl, 2001. O valor de CT (*threshold cycle*) representa o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias. O modelo matemático utilizado para obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT dos genes estudados pelo CT do HPRT (Δ CT);
- 2 - Média do Δ CT das amostras;

3 - Δ CT de cada amostra – a média do Δ CT ($\Delta\Delta$ CT);

4 - Elevação negativa do $\Delta\Delta$ CT na base 2 = $2^{-\Delta\Delta$ CT.

3.2.12. Análise Semi-Quantitativa da Proteína GLUT-4

3.2.12.1. Extração de Proteínas Totais

Para a extração de proteínas totais, o tecido adiposo epididimal foi homogeneizado em 1ml de tampão de lise (1% de Nonidet P40, 0.5% de Deoxicolato de Sódio, 0.1% de SDS diluídos em PBS 1x – 500mg de tecido/1ml de tampão de lise) contendo inibidores de proteases. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, para a remoção da parte intermediária. As proteínas contidas na parte intermediária foram quantificadas através do método de Bradford (1976).

3.2.12.2. Western Blotting

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada de acordo com método de Laemmli (1970). As amostras (30 μ g de proteína) foram aquecidas a 95°C por 5 minutos antes de serem aplicadas em gel de poliacrilamida 4%. Na lateral do gel foi aplicado um padrão de peso molecular (20-200 kDa), sendo que o GLUT-4 tem um peso molecular de, aproximadamente, 54 kDa. A eletroforese foi realizada numa cuba de acrílico, contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, SDS 0,1%), sob a voltagem de 100 Volts, por 2h.

As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para as membranas de nitrocelulose sob voltagem de 100 volts, por 1,5 h. Em seguida as membranas foram bloqueadas para as ligações inespecíficas com tampão contendo BSA 3% em TBS-T 1x e 0.05% TWEEN 20 por 1 hora. Após isso, as membranas foram incubadas com anticorpo primário para a proteína (anti-GLUT-4, na concentração de 1:4000) overnight. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T 1x e 0.05% TWEEN e, incubadas com anticorpo secundário (anti-rabbit, na concentração de 1:2000) por 1 hora. Posteriormente foi realizada a revelação por quimiluminescência utilizando solução reveladora ECL plus. Após a identificação das bandas referentes à proteína GLUT-4, foi feito, na mesma membrana, a identificação das bandas referentes ao GAPDH, que foi utilizado como controle endógeno. Para isso, foi feito o “stripping” da membrana que consiste na retirada dos anticorpos da superfície da mesma e a incubação por 1h com anticorpo primário para a proteína GAPDH (1:10000). As membranas foram então lavadas com TBS-T 1x e 0.05% TWEEN e, incubadas com anticorpo secundário (anti-mice, na concentração de 1:2000) por 1h e após, lavadas novamente. Posteriormente, foi realizada a revelação quimioluminescente utilizando solução reveladora ECL *plus*.

As bandas imuno-reativas foram quantificadas por densitometria no programa Image J quant, da National Institute of Health, USA. Os resultados foram expressos a partir da relação GLUT-4/GAPDH em unidades de densidade relativas.

3.2.13. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi utilizada para quantificar as células α da ilhota pancreática produtoras de glucagon pela técnica do complexo avidina-biotina (Hsu e cols., 1981) com modificações. Foi realizada a determinação das diluições ideais dos anticorpos primário e secundário para a imunohistoquímica. Um controle utilizando somente o anticorpo secundário foi realizado em todos os experimentos e foi negativo em todos os casos.

3.2.13.1. Processamento do Material para Análise

A região da cauda pancreática (próxima ao baço), após 48hs em solução fixadora, passou pelo processo de inclusão em paraplast®, seguindo os procedimentos descritos abaixo:

Desidratação: 30 min. em álcool absoluto I (temperatura ambiente)

30 min. em álcool absoluto II (temperatura ambiente)

30 min. em álcool absoluto III (temperatura ambiente)

Desparafinização: 30 min. em Xilol I (temperatura ambiente)

30 min. em Xilol II (temperatura ambiente)

Infiltração: Xilol 50%/Paraplast® 50% (12 horas, 63°C)

Paraplast® I (30 min. a 63°C)

Paraplast® II (30 min. a 63°C)

Inclusão: Paraplast® (63°C)

Após a inclusão em paraplast®, foram realizados cortes histológicos não seriados de 5 µ de espessura, sendo que entre um corte e outro foi descartado 150 µm, com o objetivo de se obter diferentes ilhotas pancreáticas.

3.2.13.2. Técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase

A técnica utilizada foi a da Avidina-Biotina-Peroxidase, padronizada por Hsu e cols. (1981) com modificações, utilizando-se Kit Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA). Essa técnica de imunocoloração é largamente utilizada por ser um método de alta sensibilidade e econômico. Também conhecido por complexo avidina-biotina-(ABC) peroxidase, tem como constituinte a avidina, uma glicoproteína de alto peso molecular extraída do ovo de galinha que possui alta afinidade pela biotina, uma vitamina de alto peso molecular, que é facilmente acoplada a enzimas e anticorpos. No kit utilizado nesse estudo, a biotina encontra-se conjugada tanto ao anticorpo secundário quanto à enzima peroxidase. A HPR (Horseradish Peroxidase) é uma enzima isolada da raiz da planta “horseradish”, que contém um grupo heme ligado a ferro em sua estrutura.

Assim, o princípio básico da reação de imunocoloração pelo método ABC é a alta afinidade da avidina pela biotina, que forma um complexo irreversível e amplificador da reação desejada. O anticorpo primário específico liga-se a proteína em estudo presente no tecido. Em seguida, o anticorpo secundário biotilado liga-se especificamente ao primário, deixando uma molécula de biotina exposta. Quando o complexo AB é adicionada, a avidina acopla-se

rapidamente a uma molécula de biotina, ficando com outros três sítios ativos de ligação às moléculas de biotina, conjugadas a enzima peroxidase. Por último, a adição do cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Sigma-Aldrich) na presença de peróxido de hidrogênio promove uma reação de oxi-redução do grupo heme da peroxidase, culminando na formação de um produto de coloração marrom insolúvel em álcool e outros solventes.

3.2.13.3. Protocolo de Imunohistoquímica

1º dia:

- Desparafinização dos cortes:

10 minutos xilol I

10 minutos xilol II

- Hidratação dos cortes:

5 minutos álcool 100%

5 minutos álcool 90%

5 minutos álcool 80%

5 minutos álcool 70%

5 minutos álcool 50%

- Lavagem em água deionizada por 10 minutos.

- Recuperação antigênica por 5 minutos em microondas em potência máxima: solução de ácido cítrico, pH 6, por 5 minutos.

- Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% diluído em metanol por 30 minutos.

- Lavagem com PBS 0,05M por 10 minutos.

- Bloqueio de ligação inespecífica: incubação com soro normal (Vector Laboratories) por 30 minutos (1:30).
- Incubação com anticorpo primário (anti-Glucagon – Abcam) em câmara úmida (1:200), 12-16hs a 4°C.

2º dia:

- Lavagem com PBS 0,05M.
- Incubação com anticorpo secundário (1:200, Vector Laboratories) por 30 minutos em câmara úmida escura.
- Incubação com o complexo AB (Vector Laboratories) por 1 hora em câmara úmida (1:200).
- Lavagem com PBS 0,05M por 10 minutos.
- Coloração com DAB (3,3-tetraido cloreto de diaminabenzidina) por 5 minutos.
- Lavagem com PBS 0,05M por 5 minutos.
- Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.
- Lavagem com água deionizada por 10 minutos.
- Desidratação em álcool:
 - 5 minutos em álcool 50%
 - 5 minutos em álcool 70%
 - 5 minutos em álcool 80%
 - 5 minutos em álcool 90%
 - 5 minutos em álcool 100%
- Passagem em xilol:
 - 10 minutos em xilol I

10 minutos em xilol II

- Montagem da lâmina com Entellan (Merck)

No dia seguinte, as lâminas foram observadas em microscópio óptico comum, tendo sido localizadas as dez melhores ilhotas de Langerhans de cada animal, de acordo com a coloração e integridade das células. As células alfa localizam-se na periferia da ilhota de Langerhans. As células marcadas com os anticorpos citados adquirem coloração acastanhada e são facilmente contadas e identificadas. Para avaliação de possíveis alterações na quantidade de células, optou-se pela contagem direta do número de células produtoras de glucagon de cada animal em estudo, utilizando objetiva com aumento máximo sem imersão (40X). Depois de selecionadas as dez melhores ilhotas, as células foram contadas, uma a uma, sendo cada ilhota focada individualmente no campo óptico. A contagem das células foi realizada com o auxílio do *software* Image Pro-Plus 5.0. Desse modo, de cada animal obteve-se um número médio de células produtoras de glucagon a partir da contagem de células de dez ilhotas por animal. As células foram contadas tanto nos animais do grupo controle quanto nos knockout para o receptor Mas.

3.3. Análise Estatística

O trabalho foi baseado na comparação de dados entre o grupo controle WT e o grupo KO-Mas. Para a comparação dos dois grupos foi utilizado o teste *t* de Student, não pareado. Para a análise dos testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina foi utilizada a análise de variância de duas vias (Two-way – ANOVA), seguida do teste de comparação entre curvas do tipo BONFERRONI.

Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão da média e foram considerados estatisticamente diferentes para valores de *p* menor que 0,05. A análise estatística foi feita com software Graph Pad Prism, versão 4.0 (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do Peso Corporal e da Ingestão Alimentar

As figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, o peso corporal e a ingestão alimentar em camundongos C57BL/6 KO-Mas e seu controle WT com aproximadamente 10 semanas de idade. Foi observado redução significativa do peso corporal ($21,94\text{g} \pm 0,41$ vs $23,44\text{g} \pm 0,3$ nos animais WT) e aumento significativo da ingestão alimentar ($0,19\text{g} \pm 0,003$ vs $0,1788\text{g} \pm 0,003$ nos animais WT) nos camundongos KO-Mas quando comparado aos animais controle.

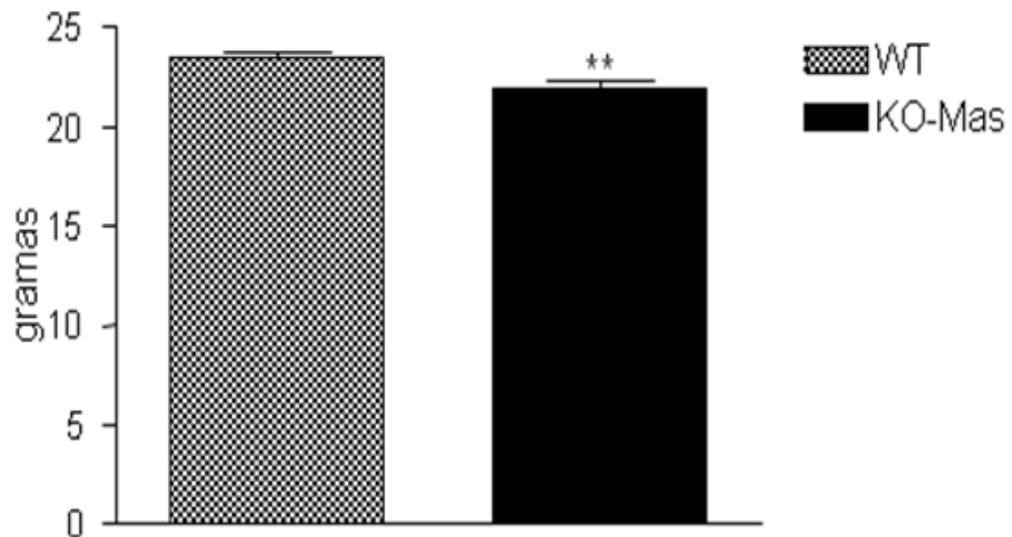


Figura 2: Peso Corporal, expresso em gramas, em camundongos C57BL/6 WT (n=16) e KO-Mas (n=16). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

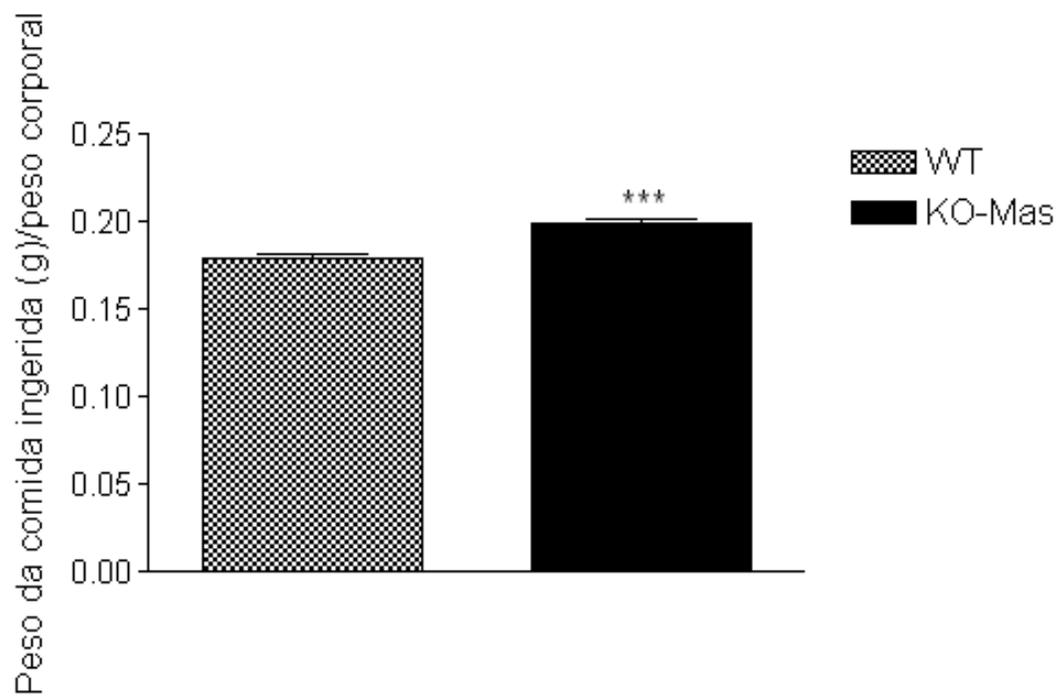


Figura 3: Ingestão alimentar em camundongos C57BL/6 WT (n=16) e KO-Mas (n=15).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

4.2. Avaliação do Peso do Tecido Adiposo Epididimal e Retroperitoneal

As figuras 4 e 5 mostram a análise do peso do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, respectivamente. Observou-se redução significativa do peso tanto do tecido adiposo epididimal ($0,82\text{g} \pm 0,06$ vs $1,28\text{g} \pm 0,12$ nos animais WT) quanto do retroperitoneal ($0,14\text{g} \pm 0,02$ vs $0,31\text{g} \pm 0,05$ nos animais WT) nos animais KO-Mas em relação ao seu controle WT.

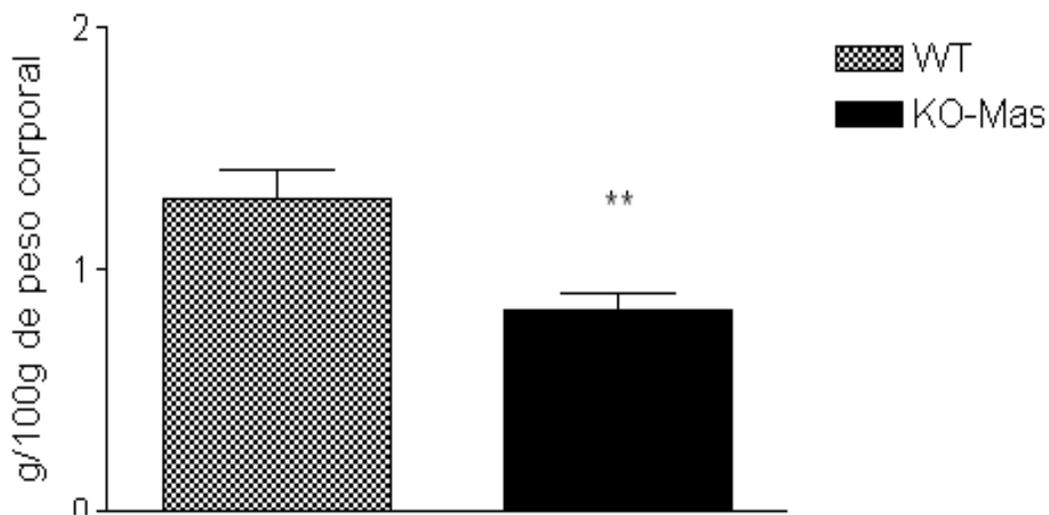


Figura 4: Peso do tecido adiposo epididimal, expresso em gramas, em camundongos C57BL/6 WT (n=16) e KO-Mas (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

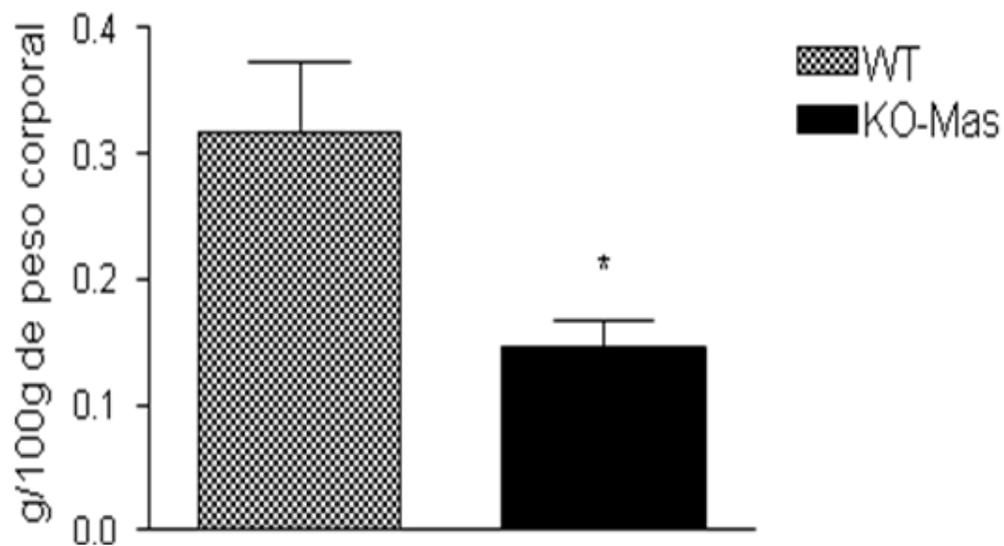


Figura 5: Peso do tecido adiposo retroperitoneal, expresso em gramas, em camundongos C57BL/6 WT (n=15) e KO-Mas (n=15). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

4.3. Avaliação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A figura 6 mostra os valores da PAS medidos por pletismografia de cauda nos animais WT e KO-Mas. Os animais WT e KO-Mas apresentaram valores basais de PAS similares, não sendo observada diferença significativa nos entre eles ($123,4 \pm 3,71$ vs. $118,2 \pm 3,14$ nos animais WT).

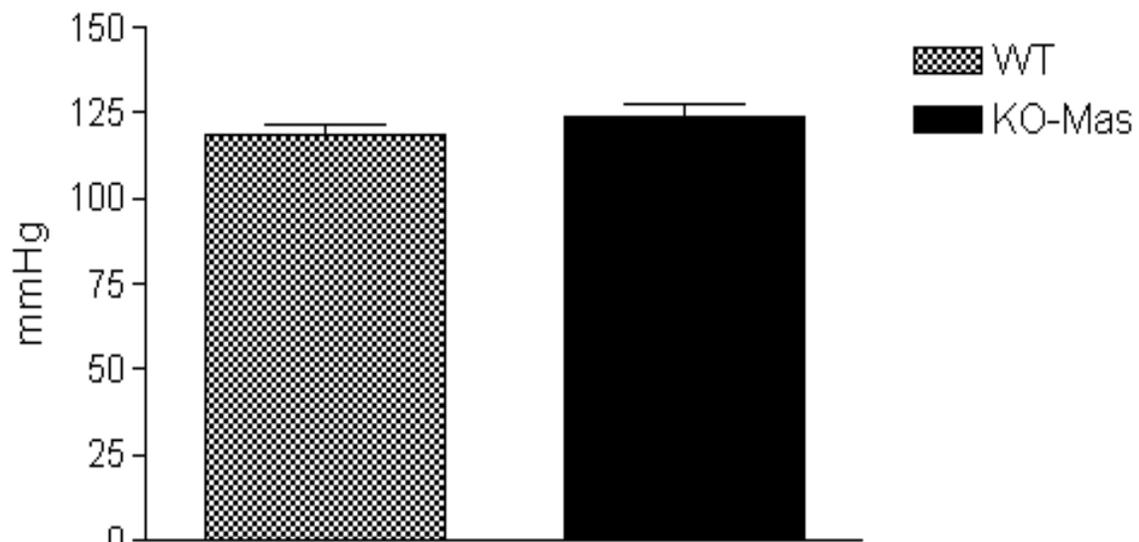


Figura 6: Valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS), expressos em mmHg obtidos por pletismografia de cauda, em camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=6).

4.4. Avaliação do Perfil Glicêmico

Durante a realização do teste de tolerância à glicose não foi observada diferença significativa nos níveis da glicemia plasmática, representada pela média dos pontos ($226,7 \text{ mg/dl} \pm 59,37$ vs $213,9 \text{ mg/dl} \pm 54,07$ no WT), comparando os dois grupos (figura 7). Porém, durante o teste de sensibilidade a insulina foi observado aumento significativo da sensibilidade à insulina ($79,0 \text{ mg/dl} \pm 10,99$ vs $100,2 \text{ mg/dl} \pm 12,60$ no WT) nos animais KO-Mas quando comparado com o WT, como mostra a figura 8.

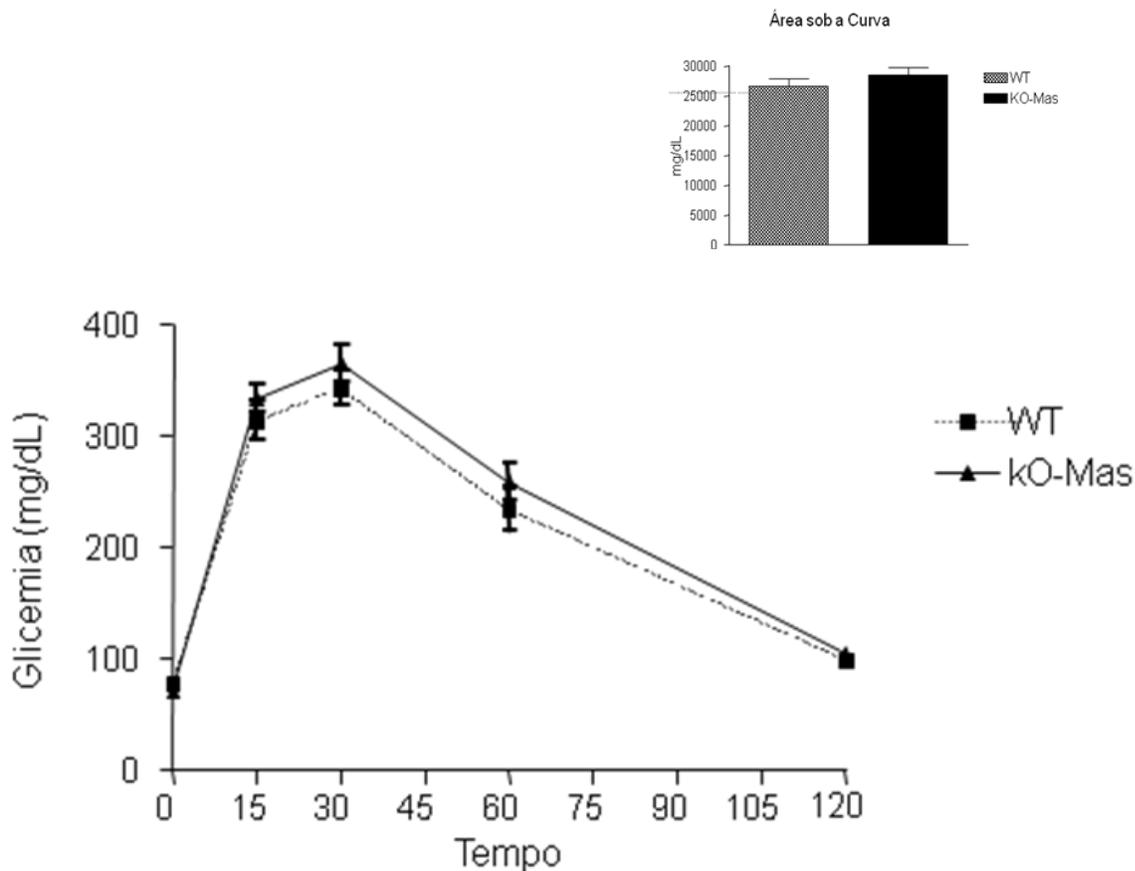


Figura 7: Níveis glicêmicos, expressos em mg/dl, durante o teste de tolerância à glicose em camundongos C57BL/6 WT (n=15) e KO-Mas (n=17).

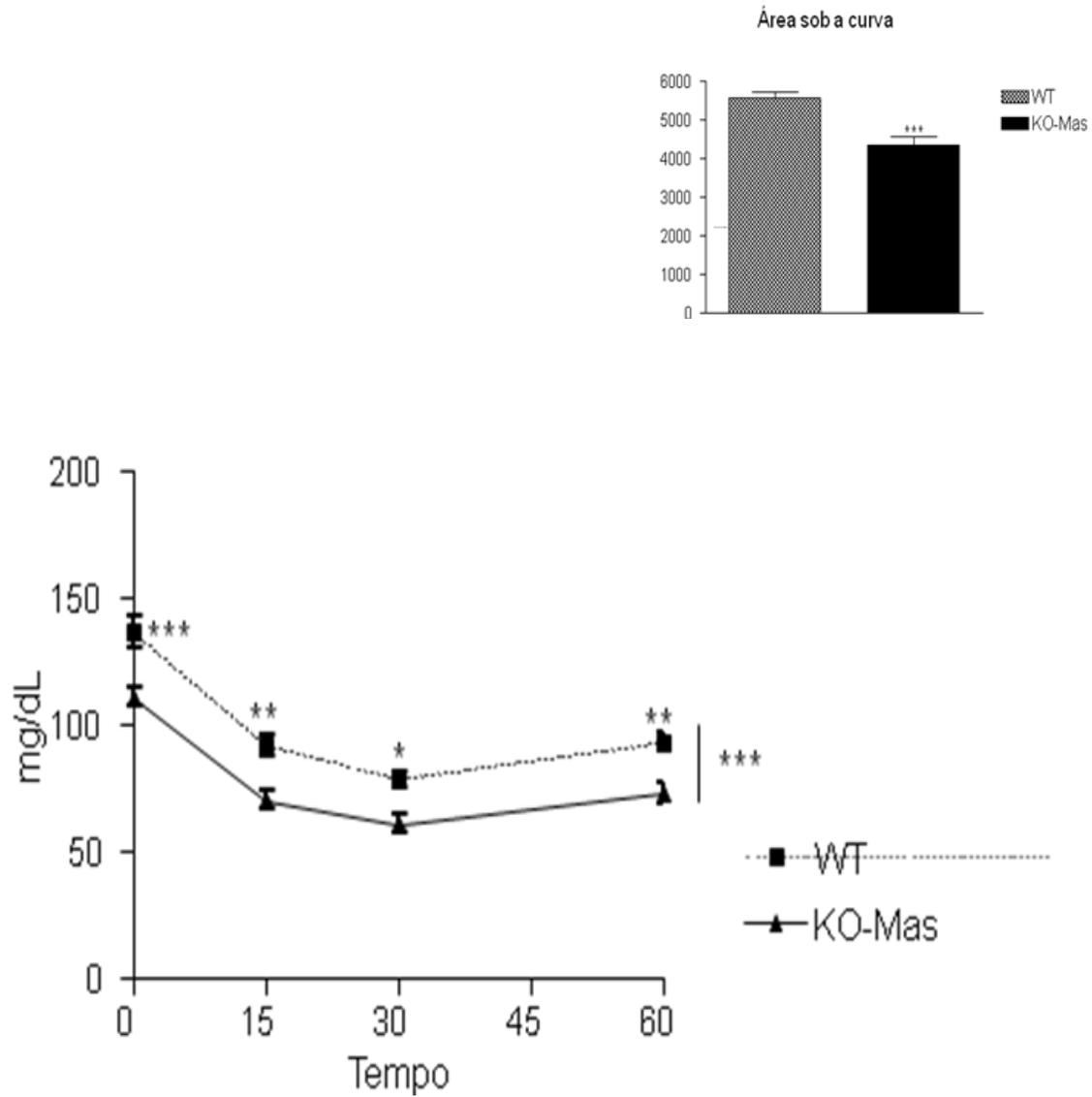


Figura 8: Níveis glicêmicos durante o teste de sensibilidade à insulina em camundongos C57BL/6 WT (n=17) e KO-Mas (n=17). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste two-way Anova, seguido do teste de Bonferroni).

4.5. Avaliação dos Níveis Séricos de Insulina

Com o objetivo de investigar a causa do aumento da sensibilidade à insulina nos animais KO-Mas, foi mensurado os níveis séricos de insulina nos dois grupos em jejum. Não foi observado nenhuma diferença significativa entre eles ($0,29 \text{ ng/ml} \pm 0,008$ vs $0,35 \text{ ng/ml} \pm 0,034$ no WT), apenas uma tendência na redução dos níveis de insulina no grupo KO-Mas, como mostra a figura 9.

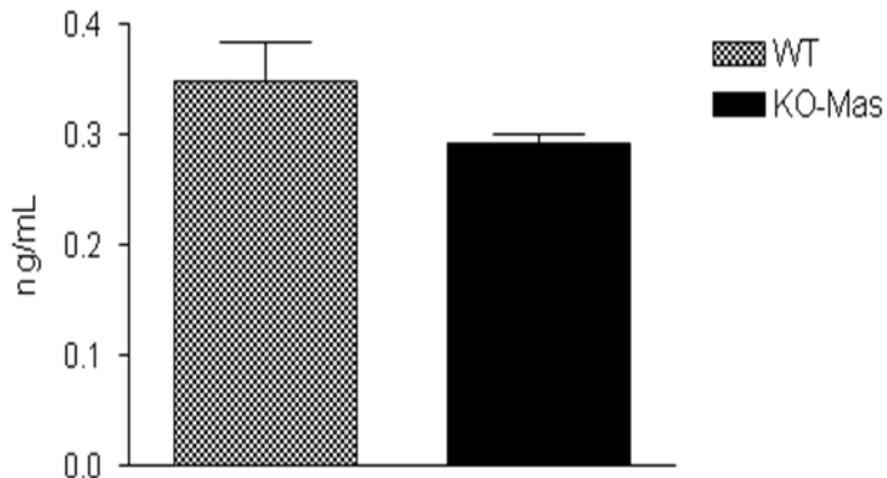


Figura 9: Níveis séricos de insulina, expressos em ng/ml, em camundongos C57BL/6 WT (n=8) e KO-Mas (n=8).

4.6. Quantificação das Células- α das Ilhotas de Langerhans Produtoras de Glucagon

Após a realização da imunohistoquímica, observou-se aumento significativo no número das células- α , localizadas na cauda pancreática (junto ao baço), nos animais KO-Mas quando comparado com o seu controle WT ($29,24\% \pm 1,49$ VS $10,71\% \pm 1,33$ no WT) (figura 10, 12 e 13). O número total de células por ilhota não diferiu entre os dois grupos (figura 11).

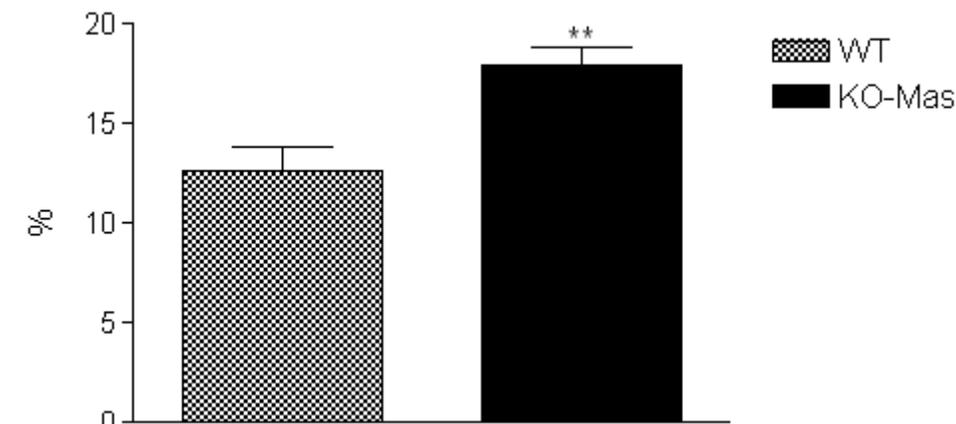


Figura 10: Número de células- α das ilhotas de Langerhans, localizadas na cauda pancreática (junto ao baço), expresso em porcentagem, nos camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=9). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste t student).

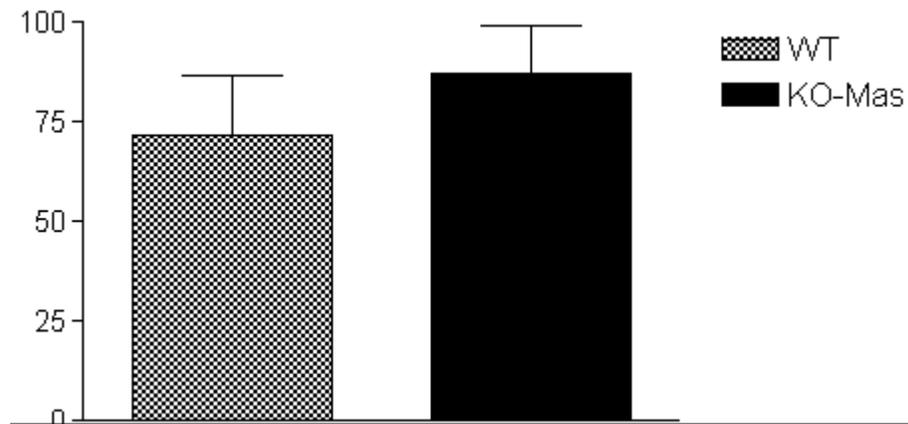


Figura 11: Total de células por ilha de Langerhans, localizadas na cauda pancreática (junto ao baço), nos camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=9).

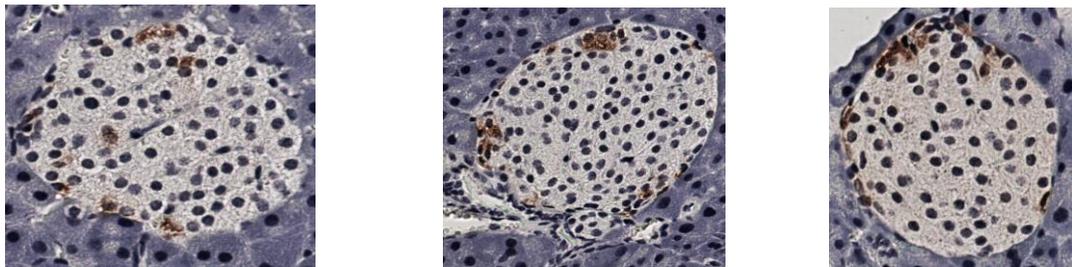


Figura 12: Figura representativa da ilha de Langerhans de animais WT. Células- α , produtoras de glucagon marcadas em marrom.

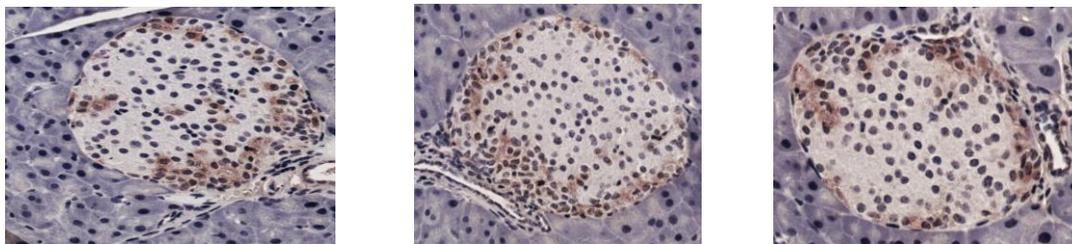


Figura 13: Figura representativa da ilha de Langerhans de animais KO-Mas. Células α , produtoras de glucagon marcadas em marrom.

4.7. Avaliação do Perfil Lipídico

As figuras 14,15 e 16 mostram os níveis séricos de colesterol total, triglicérides e ácidos graxos livres, respectivamente, nos animais WT e KO-Mas em jejum. Não foi observado nenhuma diferença significativa entre eles (74,63 mg/dl \pm 6,63 vs 69,0 mg/dl \pm 8,69 no WT; 73,26 mg/dl \pm 11,13 vs 57,90 mg/dl \pm 9,52 no WT e 1,71 mmol/l \pm 0,04 vs 1,58 mmol/l \pm 0,08 no WT).

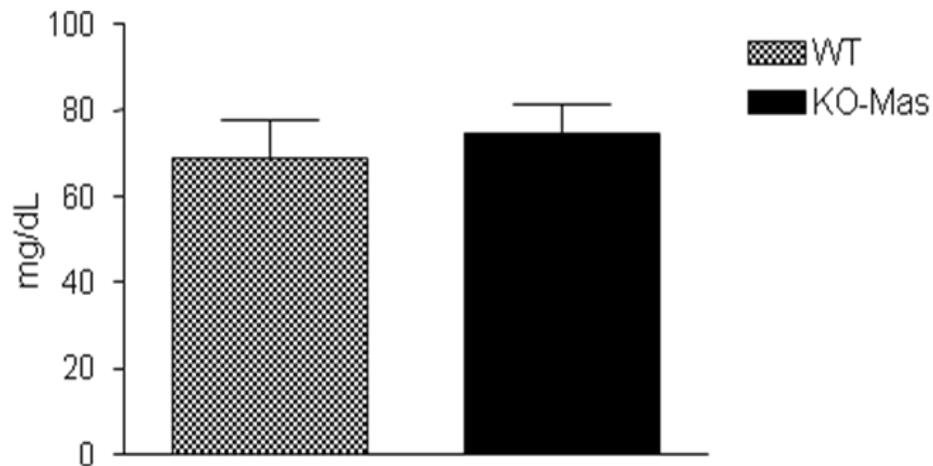


Figura 14: Níveis séricos de colesterol total, expressos em mg/dL, em camundongos C57BL/6 WT (n=9) e KO-Mas (n=9) nos animais WT e KO-Mas.

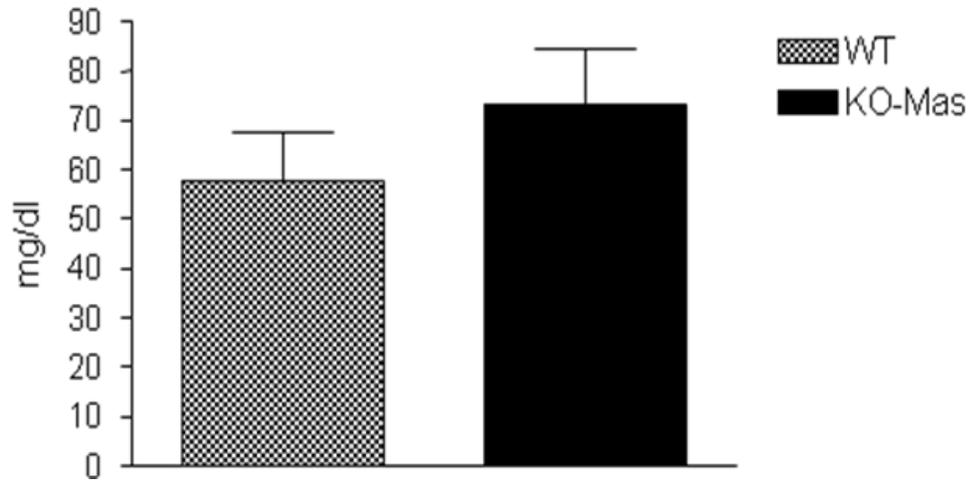


Figura 15: Níveis séricos de triglicérides, expressos em mg/dl, em camundongos C57BL/6 WT (n=7) e KO-Mas (n=8).

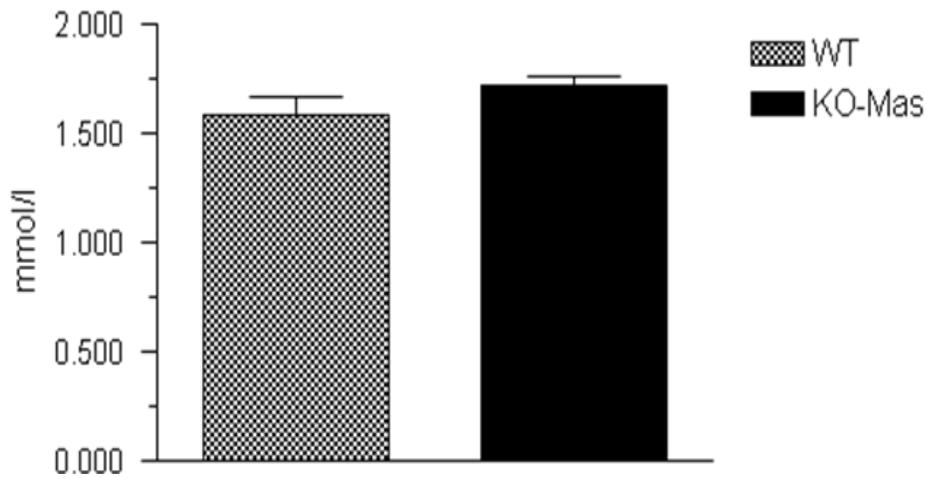


Figura 16: Níveis de ácidos graxos livres, expressos em mmol/l, em camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=6).

4.8. Expressão da Proteína GLUT-4 no Tecido Adiposo Epididimal

A expressão da proteína GLUT-4 no tecido adiposo epididimal é mostrada na figura 17. Não foi observada diferença significativa na expressão dessa proteína entre os grupos ($1,26 \pm 0,14$ vs $1,32 \pm 0,18$ no WT).

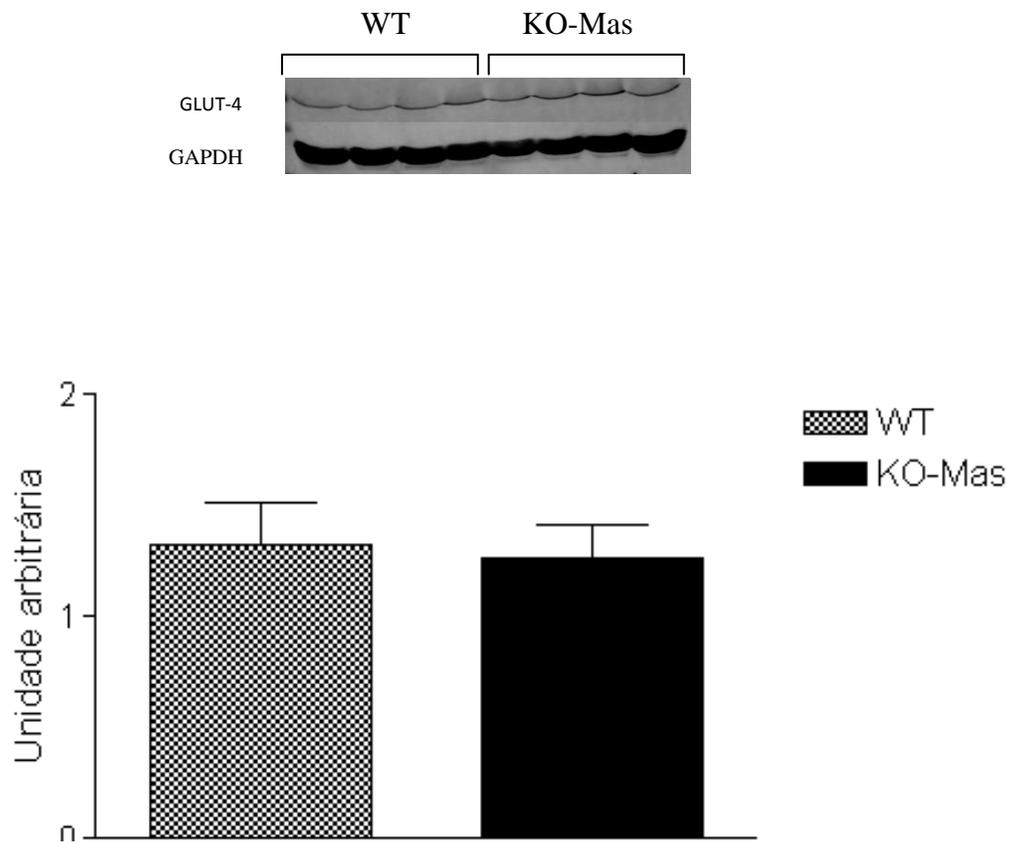


Figura 17: Expressão da proteína GLUT-4, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=4) e KO-Mas (n=4).

4.9. Expressão Gênica do Angiotensinogênio, Receptor AT₁, TNF- α , TGF- β e Receptor de Insulina no Tecido Adiposo Epididimal

As figuras 18, 19, 20, 21 e 22 mostram a expressão gênica do angiotensinogênio, receptor AT₁, TGF- β , TNF- α e receptor de insulina, respectivamente, no tecido adiposo epididimal. Não foi observado diferença significativa na expressão gênica do AOG ($1,33 \pm 0,27$ vs $1,10 \pm 0,19$ no WT), TNF- α ($4,94 \pm 1,9$ vs. $1,46 \pm 0,70$ no WT) e receptor de insulina ($2,55 \pm 0,90$ vs. $1,38 \pm 0,47$ no WT) quando comparado os animais KO-Mas com seu controle WT. Porém, foi observado aumento significativo na expressão do *mRNA* para o TGF- β ($2,22 \pm 0,48$ vs $1,10 \pm 0,22$ no WT) e receptor AT1 ($4,1 \pm 0,83$ vs. $1,3 \pm 0,37$ no WT) nos animais KO-Mas em relação ao WT.

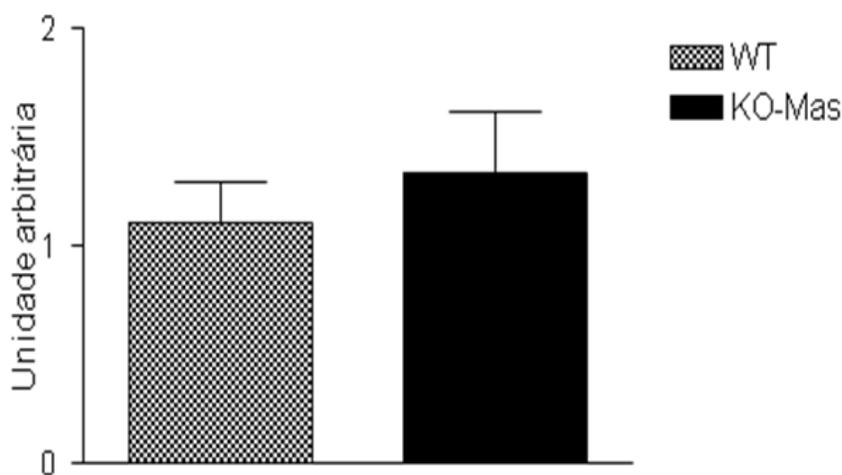


Figura 18: Expressão do *mRNA* para o angiotensinogênio, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=4).

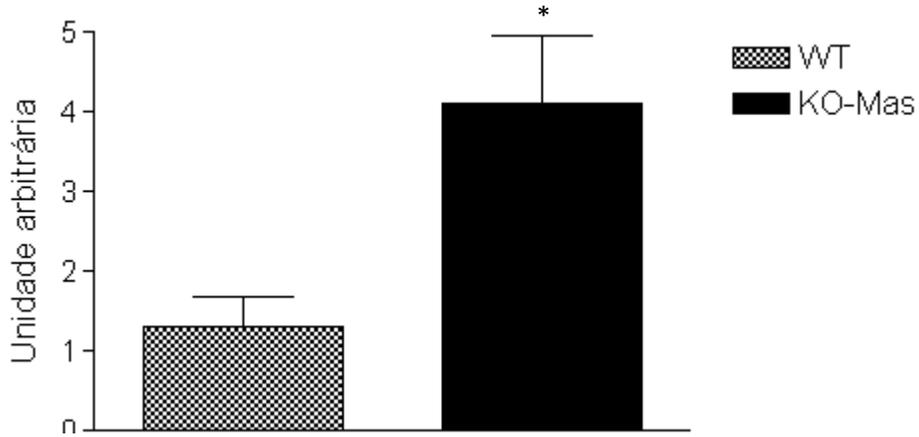


Figura 19: Expressão do *mRNA* para o receptor AT₁, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=7) e KO-Mas (n=7) . * p < 0,05 em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

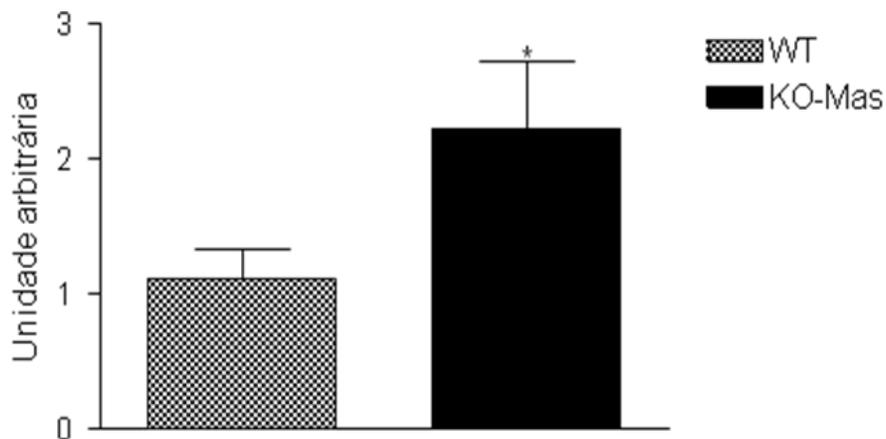


Figura 20: Expressão do *mRNA* para TGF- β , no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=4) . * p < 0,05 em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

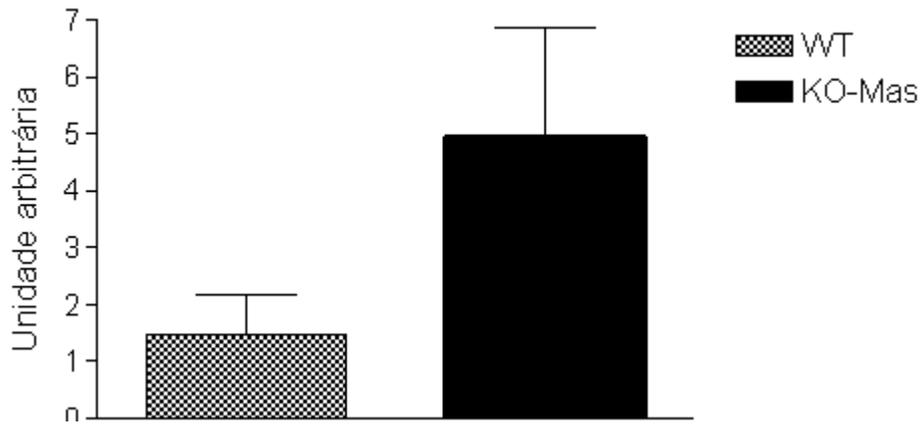


Figura 21: Expressão do *mRNA* para o TNF- α , no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=5) e KO-Mas (n=7) .* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

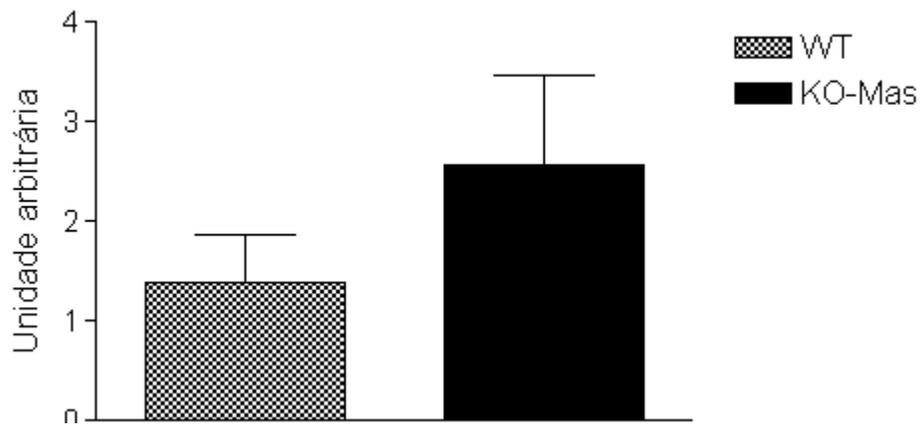


Figura 22: Expressão do *mRNA* para o receptor de insulina, no tecido adiposo epididimal, de camundongos C57BL/6 WT (n=6) e KO-Mas (n=7) .* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste *t* student).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que camundongos machos, adultos C57BL/6 knockout para o receptor Mas apresentaram redução significativa do peso corporal, da massa adiposa epididimal e retroperitoneal, porém com uma maior ingesta alimentar. Além disso, foi observado aumento significativo do número de células α das ilhotas pancreáticas produtoras de glucagon. Em adição, houve aumento significativo da sensibilidade à insulina associado a uma tendência na redução dos níveis séricos de insulina em relação ao grupo controle.

Por outro lado, esses animais não apresentaram alterações nos níveis glicêmicos durante o jejum e nem após sobrecarga de glicose. Da mesma forma, não houve diferença significativa na expressão protéica do GLUT4, na expressão gênica do receptor de insulina, AOG e TNF- α no tecido adiposo epididimal e nem no perfil lipídico. Entretanto, houve aumento significativo do *mRNA* para o TGF- β e receptor AT₁ no tecido adiposo epididimal.

Em relação aos níveis da PAS, não foi observado diferença significativa nos camundongos C57BL/6 KO-Mas quando comparado com o grupo controle.

Em estudo anterior realizado em camundongos FVB/N knockout para o receptor Mas foi observado que a deleção genética desse receptor produziu profundas alterações do metabolismo glicêmico e lipídico. Esses animais apresentaram aumento da massa adiposa epididimal e retroperitoneal, resistência à insulina e dislipidemia, caracterizando esses animais como modelo de síndrome metabólica. Além disso, foi observado aumento da expressão do *mRNA* do AGT e TGF- β e, redução da expressão da proteína GLUT-4 no tecido adiposo epididimal (Santos e cols., 2008). Dessa forma, esses achados indicam que o papel do receptor Mas no metabolismo glicêmico e lipídico é grandemente influenciado pelo background genético.

Nossos achados estão em consonância com outros estudos em animais geneticamente modificados que mostraram respostas metabólicas diferentes de acordo com a linhagem estudada, sendo os camundongos da linhagem B6 mais resistentes ao desenvolvimento de Diabetes. A deficiência do gene para a leptina produziu, em camundongos C57BL/6, menor hiperglicemia e resistência muscular às ações da insulina quando comparado com o FVB/N, apresentando mesmo grau de obesidade e hiperinsulinemia (Haluzik e cols., 2004). Em modelo de lipoatrofia em camundongos A-ZIP/F-1, a linhagem C57BL/6 apresentou menor hiperglicemia, dislipidemia e resistência muscular à insulina e, maior clearance de triglicérides quando comparado com o FVB/N. Já a resistência insulínica e deposição de ácidos graxos no fígado apresentaram tendência oposta (Colombo e cols., 2003).

Essas diferentes respostas não são encontradas apenas quando se estuda o metabolismo glicêmico e lipídico. Resultados opostos também foram observados com relação aos parâmetros cardiovasculares, no estado basal, em camundongos com deleção genética do receptor Mas. A linhagem C57BL/6 não apresentou alteração da pressão arterial sistólica (Rabelo e cols., 2008), o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Esses dados podem ser explicados pela ausência de alteração nos níveis circulantes de Ang I e Ang II e, atividade da renina plasmática nesses animais (Rabelo e cols., 2008). Já a linhagem FVB/N apresentou aumento significativo dos níveis pressóricos quando comparado com o seu controle WT (Xu e cols., 2008). Além disso, a disfunção endotelial foi mais acentuada nos camundongos FVB/N KO-Mas quando comparados com os da linhagem C57BL/6. Outro modelo animal com um dos componentes do SRA modificado geneticamente, a deleção do gene para a ECA2, também apresentou resultados inconsistentes com relação aos níveis pressóricos, dependendo do background genético estudado (Gurley e cols., 2006). No modelo animal de hipertensão DOCA-

salt os camundongos da linhagem C57BL/6 foram mais resistentes ao desenvolvimento da hipertensão arterial quando comparado com outras linhagens (Hartner e cols., 2003). Outra razão para a diferente susceptibilidade à hipertensão arterial seria a diferença no número de genes para renina: camundongos C57BL/6 têm apenas um gene para renina (*Ren-1^c* resultando em duas cópias para o gene de renina), enquanto que a linhagem FVB/N apresenta dois genes para renina (*Ren-1^d* e *Ren-2* resultando em quatro cópias para o gene de renina) (Hansen e cols., 2004).

As alterações na função renal também são background-dependente nos camundongos KO-Mas. Recente trabalho de Pinheiro e colaboradores (2009) mostrou que a linhagem C57BL/6 apresenta alterações renais não encontradas na linhagem FVB/N (Dados ainda não publicados), como retenção renal de sódio e água, fibrose e inflamação renal, aumento da filtração glomerular, proteinúria e tendência a glomeruloesclerose. Assim, esses trabalhos sugerem que fatores genéticos aumentam a predisposição para o desenvolvimento de desordens metabólicas e cardiovasculares.

Como descrito anteriormente, em nosso estudo os camundongos C57BL/6 KO-Mas apresentaram redução do peso corporal e da massa adiposa (epididimal e retroperitoneal), porém associados à maior ingestão alimentar. Esses resultados estão em contraste com achados que mostram o papel protetor do eixo Ang-(1-7)/Mas no ganho do peso corporal e da massa adiposa. Camundongos com deleção genética do receptor Mas, da linhagem FVB/N (Santos e cols., 2008), apresentaram aumento da massa adiposa epididimal e retroperitoneal, provavelmente devido à maior proliferação dos adipócitos, já que não foi observado alterações no peso corporal e na ingestão alimentar. Além disso, recente trabalho realizado pelo mesmo grupo (dados não publicados) mostrou que ratos transgênicos, TGR(A1-7)3292 (TGR-L3292), caracterizados por elevação crônica (2-3 vezes) dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7), apresentaram redução do peso

corporal e da massa adiposa epididimal, indicando que o heptapeptídeo Ang-(1-7) poderia participar do controle do gasto energético.

Já Cassis e colaboradores (1998) demonstraram que, em ratos Sprague Dawley, a infusão crônica de Ang II reduziu o peso corporal e a massa do tecido adiposo retroperitoneal. Esse resultado pode ser explicado provavelmente devido à maior liberação de catecolaminas, contribuindo para o aumento da atividade metabólica, com conseqüente aumento da mobilização da massa adiposa e gasto energético.

O aumento da ingestão alimentar observada nos camundongos C57BL/6 KO-Mas mostra que a redução do peso corporal e da massa adiposa não resultou da redução do apetite, mas sim de mudanças metabólicas e neurais. Evidências mostram que a Ang II facilita o sistema nervoso simpático (SNS) (English & Cassis, 1999) e, mais do que isso, o SNS é importante no controle do metabolismo lipídico periférico. A ativação do SNS resulta em aumento de noradrenalina e adrenalina circulante, que agindo em receptores β_3 -adrenérgico no tecido adiposo, estimula diretamente a lipólise por ativar a enzima lipase hormônio-sensível (Nonogaki, 2000). Mesmo os camundongos C57BL/6 KO-Mas não apresentando aumento dos níveis circulantes da Ang II, a ausência do eixo Ang-(1-7)/Mas pode ter contribuído para uma maior ativação simpática. Na verdade, Walther e colaboradores (2000) mostraram que camundongos da linhagem C57BL/6, deficientes do receptor Mas, apresentam aumento da atividade simpática.

Além do tecido adiposo, o pâncreas também é inervado pelo SNS. A secreção de glucagon é alterada em resposta a estimulação nervosa pancreática, sendo que a ativação da atividade simpática resulta em aumento da secreção de glucagon pelas células α da ilhota pancreática (Shimazu e cols., 1996). Como conseqüência de uma maior quantidade de células α produtoras de glucagon, observado nos camundongos C57BL/6 KO-Mas, associado ao aumento

da atividade simpática, esses animais provavelmente apresentam maior quantidade de glucagon circulante. O glucagon apresenta efeito catabólico, principalmente por ativar a glicogenólise e a gliconeogênese hepática (Dunning e cols., 2007), já que a sua atividade lipolítica ainda é contraditória. Em adipócitos de rato (Heckemeyer e cols., 1983) e humano (Perea e cols., 1995) o glucagon aumentou a lipólise. No entanto, a infusão subcutânea de glucagon no tecido adiposo abdominal de indivíduos saudáveis não apresentou efeito lipolítico (Gravholt e cols., 2001). Assim, o aumento de glucagon circulante também pode ser responsável pela redução da massa adiposa e do peso corporal encontrada nos camundongos C57BL/6 KO-Mas. Estudos posteriores poderão esclarecer essa possibilidade.

É sabido que o SRA apresenta papel importante no controle do metabolismo glicêmico e lipídico (Ran e cols., 2004; Wei e cols., 2006; Santos e cols., 2008; Giani e cols., 2009). Os principais peptídeos deste sistema são representados pela Ang II, que tem ação vasoconstritora, e o heptapeptídeo vasodilatador Ang-(1-7). No metabolismo glicêmico, a Ang II via receptor AT₁, resulta no desenvolvimento da resistência à insulina, por ativar a via da MAPK (proliferativa e mitogênica) e inibir a via da PI3K/AKT (metabolismo glicêmico) (Marrero e cols., 2004; Wei e cols., 2006). A maioria das ações desse peptídeo são contrarreguladas pelas ações da Ang-(1-7) via receptor Mas. Na literatura, existem evidências da importância do eixo Ang-(1-7)/Mas na regulação do metabolismo glicêmico e lipídico (Santos e cols., 2008; Giani e cols., 2009). Em camundongos FVB/N, com deleção genética do receptor Mas (Santos e cols., 2008), foi observado aumento significativo dos níveis glicêmicos durante o teste de tolerância à glicose associado à menor sensibilidade dos tecidos à ação da insulina. Além disso, os camundongos dessa linhagem apresentaram aumento significativo dos níveis séricos de insulina e redução da expressão protéica do GLUT-4 no tecido adiposo epididimal. Esses achados foram corroborados

por Giani e cols. (2009). Ratos Sprague-Dawley, tratados cronicamente com Ang-(1-7), apresentaram redução dos níveis plasmáticos de insulina, os quais estavam aumentados após 6 semanas de frutose 10% na água de beber. Além disso, o heptapeptídeo Ang-(1-7) desviou a via de sinalização da insulina para IR/IRS-1/PI3K/AKT no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, revertendo o estado de resistência à insulina. Dentro desse contexto, outro trabalho de nosso grupo, descreveu que ratos TG-L3292, que superexpressam Ang-(1-7) circulante (TG L3292), apresentaram maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. O aumento da sensibilidade à insulina foi associado ao aumento da AKT total e fosforilada no tecido adiposo epididimal, indicando que o eixo Ang-(1-7)/Mas poderia participar do controle glicêmico (Dados não publicados).

Os resultados encontrados em nosso trabalho diferiram dos dados descritos acima. Nos camundongos C57BL/6 KO-Mas não foi observado alteração da glicemia plasmática durante o teste de tolerância à glicose, o que está de acordo com a não alteração na expressão protéica do GLUT-4 no tecido adiposo epididimal. Porém, foi observado aumento significativo da sensibilidade à insulina associado a uma tendência na redução dos níveis séricos de insulina quando comparado com seu controle WT. A maior sensibilidade à insulina nos animais KO-Mas contrasta com a curva de tolerância à glicose, que está normal nos dois grupos estudados, o que sugere uma deficiência na liberação de insulina pelas células β da ilhota pancreática ou aumento dos níveis circulantes de glucagon, normalizando os valores glicêmicos nos animais com deleção do receptor Mas.

A sensibilidade à insulina aumentada, observada nos animais do presente estudo, pode ser explicada pela menor quantidade de insulina circulante observada nesses animais, mesmo esse dado não sendo estatisticamente diferente. Como consequência os receptores de insulina

poderiam estar aumentados, mantendo os níveis glicêmicos dentro da normalidade. Porém, no tecido adiposo epididimal dos camundongos C57BL/6 KO-Mas a expressão do *mRNA* para o receptor de insulina não apresentou diferença significativa quando comparada com o grupo controle. No entanto, não foi avaliada a expressão desse gene no músculo esquelético, que é considerado o principal tecido responsável pela captação e utilização de glicose sanguínea (Nonogaki, 2000).

É sabido que alguns componentes do SRA estão presentes no pâncreas e apresentam papel importante no controle da secreção de insulina pelas células β da ilhota pancreática. A liberação de insulina estimulada por glicose foi reduzida de forma dose-dependente pela adição de Ang II em ilhotas isoladas de camundongos da linhagem C57BL/6. Esse efeito foi mediado via receptor AT_1 , já que o pré-tratamento das ilhotas com losartan restaurou completamente a secreção de insulina pelas células β pancreática (Lau e cols., 2004). Assim, uma possível explicação para a redução da secreção de insulina pelas células β da ilhota pancreática, seria o desbalanço na ativação dos dois eixos contra-regulatórios do SRA, reduzindo assim os níveis circulantes desse hormônio nos camundongos C57BL/6 KO-Mas.

Dados na literatura apontam para o papel da insulina na regulação da secreção do glucagon (Bansal e cols., 2008). A redução da secreção de insulina pelas células β da ilhota pancreática resulta na ausência de inibição da secreção de glucagon, aumentando assim sua secreção pelas células α da ilhota pancreática. O principal efeito do glucagon é impedir a hipoglicemia, estimulando a produção hepática de glicose através da glicogenólise e da gliconeogênese. Assim, o desbalanço entre a secreção de insulina e glucagon contribui para a intolerância à glicose, hiperglicemia, microalbuminúria e injúria glomerular (Li e cols., 2008). Dessa forma, hipotetizamos que reduzida secreção de insulina associada ao aumento da atividade

simpática e maior quantidade de células α pancreática nos camundongos C57BL/6 KO-Mas, resultaria em aumento da secreção de glucagon. Como conseqüência, esperava-se aumento dos níveis glicêmicos. No entanto, a ausência de hiperglicemia nos camundongos KO-Mas deve ser conseqüência da sensibilidade aumentada dos tecidos periféricos à ação da insulina.

É usualmente descrito que a resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina leva a disfunção endotelial (Kim e cols., 2006). O nosso estudo dissocia a relação entre esses dois fatores de risco cardiovasculares, já que os camundongos C57BL/6 KO-Mas apresentam disfunção endotelial (Rabelo e cols., 2008), porém aumentada sensibilidade dos tecidos à ação da insulina.

Em relação ao papel do SRA no metabolismo lipídico, a ativação do eixo Ang II/receptor AT₁ tem papel importante no desenvolvimento da dislipidemia, sendo que o bloqueio desse eixo previne essa alteração. Ferreira e cols. (2004) mostraram que a infusão de Ang II, em ratos, resultou em aumento plasmático de AGL, sendo que sua mobilização foi reduzida em presença de propranolol. De acordo com esses achados, ratos Zucker obesos (ZF), um modelo animal de resistência à insulina, apresentaram redução dos níveis de ácidos graxos livres após tratamento por quatro semanas com bloqueador do receptor AT₁, porém sem alteração nos níveis de colesterol total e HDL-c. Os níveis de triglicérides também foram reduzidos, mas esse dado não foi estatisticamente significativo. No entanto, a taxa de secreção e o conteúdo hepático de triglicérides foram reduzidos pela metade nos animais tratados (Ran cols., 2004). Em outro estudo, de Mizuno e cols. (2002), usando o mesmo modelo animal, o tratamento com Olmesartan por 19 semanas reduziu significativamente os níveis de triglicérides plasmáticos.

Por outro lado, a ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas resulta em ações opostas àquelas mediadas pela Ang II. Tratamento crônico com Ang-(1-7) reduziu os níveis plasmáticos de

triglicérides em modelo de rato diabético (Giani e cols., 2009). Esses dados estão de acordo com dados ainda não publicados de Santos e colaboradores. Ratos TG L3292, com elevação crônica dos níveis circulantes de Ang-(1-7), apresentaram redução significativa dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides, mostrando que o heptapeptídeo Ang-(1-7) apresenta papel importante na regulação do metabolismo lipídico. Esses dados são reforçados pelo estudo realizado em camundongos FVB/N, com deleção genética do receptor Mas, que mostrou aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides (Santos e cols., 2008). Já no presente estudo, os camundongos C57BL/6 com deleção do receptor Mas, não apresentaram alteração nos níveis séricos de colesterol total, triglicérides e ácidos graxos livres. A insulina, um hormônio anabólico, age principalmente estimulando o armazenamento de glicose, proteínas e lipídios. Assim, da mesma forma que na curva de glicemia, os níveis lipídicos contrastam com a aumentada sensibilidade dos tecidos à ação da insulina (Dunning e cols., 2005).

Sabe-se que a dislipidemia é um dos maiores componentes da síndrome de resistência à insulina e, freqüentemente acompanha o *Diabetes Mellitus* tipo 2. O quadro de resistência à insulina estimula a produção hepática de VLDL, importante proteína transportadora de triglicérides produzido endogenamente e de AGL (Lewis e cols., 2002). Assim, a manutenção dos níveis lipídicos, dentro da faixa de normalidade, pode ser consequência da aumentada sensibilidade dos tecidos à ação da insulina nesses animais.

O tecido adiposo é visto hoje como um órgão endócrino, produzindo e secretando na circulação várias adipocitocinas, as quais apresentam papel importante tanto no metabolismo local quanto sistêmico. Alguns componentes do SRA, presentes no tecido adiposo, estão aumentados na obesidade. Hainault e cols. (2002) mostraram que ratos Zucker obesos

apresentaram aumento da secreção e expressão do *mRNA* para o AOG no tecido adiposo. Resultado semelhante foi observado por Santos e colaboradores (2008) em camundongos FVB/N KO-Mas. Estes animais apresentaram aumento da expressão do *mRNA* para o AGT no tecido adiposo, o qual foi associado à maior massa adiposa. No presente estudo a expressão do *mRNA* para o AOG no tecido adiposo epididimal não apresentou diferença significativa entre os grupos. Esse resultado pode ser justificado pela ausência de obesidade nos camundongos da linhagem C57BL/6 KO-Mas. Como os níveis de AOG estão correlacionados com o grau de obesidade, esperava-se encontrar uma redução na expressão do *mRNA* para o AOG, já que esses animais apresentaram uma redução significativa na massa adiposa epididimal.

Já a expressão do *mRNA* para o receptor AT₁ apresentou aumento significativo no tecido adiposo epididimal dos camundongos C57BL/6 com deleção genética do receptor Mas. Trabalhos mostram que a expressão desse receptor também está aumentada no tecido adiposo em presença de obesidade (Giacchetti e cols., 2002; Engeli e cols., 2003). O aumento local da expressão do receptor AT₁ sugere aumento da atividade do eixo Ang II/AT₁ no tecido adiposo epididimal. Como o papel da Ang II na diferenciação dos adipócitos ainda é controverso, esse peptídeo pode ter efeito antiadipogênico no modelo animal do presente estudo, que agindo via receptor AT₁ inibe a adipogênese, reduzindo a massa adiposa.

O TNF- α , uma citocina também produzida e secretada pelo tecido adiposo, está envolvida em vários processos inflamatórios (Yudkin e cols., 2007). No presente estudo não foi observado alteração na expressão do *mRNA* para o TNF- α nos animais C57BL/6 com deleção genética do receptor Mas, indicando ausência de inflamação no tecido adiposo epididimal. Esse dado está de acordo com o observado em camundongos FVB/N KO-Mas, os quais também não

apresentaram alteração na expressão gênica para o TNF- α no tecido adiposo epididimal (Santos e cols., 2008).

Outra adipocitocina estudada em nosso trabalho foi o TGF- β , uma citocina fundamental para a manutenção da homeostasia entre o crescimento e apoptose celular. A exposição das células ao TGF- β pode resultar em uma variedade de respostas celulares incluindo proliferação, crescimento, diferenciação e apoptose celular, dependendo da via intracelular ativada (Sánchez-Capelo, 2005). No presente estudo, a expressão gênica do TGF- β apresentou aumento significativo no tecido adiposo epididimal dos animais C57BL/6 KO-Mas quando comparado com os animais controle WT. Esse dado está de acordo ao encontrado em camundongos da linhagem FVB/N KO-Mas, porém nesses animais, o aumento da expressão gênica do TGF- β foi associado ao aumento da massa adiposa epididimal e proliferação dos adipócitos (Santos e cols., 2008). Como os camundongos C57BL/6 KO-Mas apresentaram redução da massa adiposa, o aumento na expressão do gene para o TGF- β pode ser um mecanismo de feedback para compensar a redução da massa do tecido adiposo encontrada nesses animais. Outra hipótese seria com relação à ação apoptótica do TGF- β , resultando em morte celular e, conseqüentemente na redução da massa adiposa. Assim, provavelmente o eixo Ang-(1-7) controla a produção e a secreção dessa adipocitocina pelos adipócitos.

Sumarizando, o fenótipo observado em camundongos da linhagem FVB/N com deficiência do receptor Mas não é observado em outro background genético, no caso a linhagem C57BL/6. O fenótipo encontrado nos camundongos C57BL/6 KO-Mas difere quase totalmente daquele encontrado na linhagem FVB/N. Provavelmente os camundongos FVB/N são mais sensíveis a deleção genética do receptor Mas, que somando-se a presença de dois genes para renina, resulta em importantes alterações metabólicas e hemodinâmicas.

6. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Em nosso estudo foram observadas às seguintes alterações fenotípicas em camundongos da linhagem C57BL/6 knockout para o receptor Mas:

1. Redução do peso corporal, associado com uma maior ingesta alimentar.
2. Redução acentuada do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal.
3. Aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à ação da insulina.
4. Maior número de células α das ilhotas de Langerhas produtoras de glucagon.
5. Aumento da expressão gênica do receptor AT_1 e do $TGF-\beta$ no tecido adiposo epididimal.

Por outro lado, não foram observadas alterações nos níveis pressóricos, nos níveis glicêmicos durante o teste de tolerância a glicose, nos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, ácidos graxos livres e insulina, na expressão protéica do GLUT-4 e na expressão gênica para o angiotensinogênio, $TNF-\alpha$ e receptor de insulina no tecido adiposo epididimal.

Concluindo, os resultados obtidos no presente estudo mostram pela primeira vez que o efeito do eixo $Ang-(1-7)/Mas$ no controle do metabolismo glicêmico e lipídico é altamente dependente do background genético estudado. Além disso, mostramos a importância das alterações genéticas no desenvolvimento de várias doenças metabólicas e cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida A.P., Frábregas B.C., Madureira M.M., Santos R.J.S., Campagnole-Santos M.J., Santos R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradycinin in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res.* 33(6):709-713, 2000.
- Bansal P., Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E751-E761, 2008.
- Batenburg W.W., Garrelds I., Bernasconi C.C., Juilerrat-Jeanneret L., Van Kats J.P., Saxena P.R., Danser J. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation.* 109(19):2296-2301, 2004.
- Bardford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Burrell L.M., Johnston C.I., Tikellis C., Cooper M.E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends End and Metab.* 15(4):166-169, 2004.
- Campagnole-Santos M.J., Diz D.I., Santos R.A.S., Khosla M.C., Brosnihan K.B., Ferrario C.M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol.* 257(1 Pt2):H324-329, 1989.
- Campagnole-Santos M.J., Heringer S.B, Batista E.N, Khosla M.C, Santos R.A.S. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 263(1 Pt 2): R89-94, 1992.
- Carey R.M., Howell N.L., Jin X.H., Siragy H.M. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension.* 38(6):1272-1277, 2001.
- Carvalho-Filho M.A., Carvalheira J.B.C., Velloso L.A., Saad M.J.A. Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2:195-203, 2007.
- Cassis L.A., Marshall D.E., Fettingner M.J., Rosenbluth B., Lodder R.A. Mechanism contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol.* 274(5 Pt 1):E867-E876, 1998.
- Cassis L.A., Police S.B., Yiannikouris F., Thatcher S.E. Local adipose tissue rennin-angiotensin system. *Current Hypertension Report.* 10(2):93-98, 2008.
- Castro H.C., Santos R.A.S., Ferreira A.J., Bader M., Alenina N., Almeida A.P. Effect of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Science.* 80:264-268, 2006.

- Chappell M.C., Pirro N.T., Sykes A., Ferrario C.M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 31(1 Pt2):362-367, 1998.
- Cheng Z.J., Vapatalo H., Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*. 11(6):RA194-205, 2005.
- Colombo C., Haluzik M., Cutson J.J., Dietz K.R., Marcus-Samuels B., Vinson C., Gavrilova O., Reitman M.L. Opposite effects of background genotype on muscle and liver insulin sensitivity of lipoatrophic mice. *J Bio Chem*. 278(6):3992-3999, 2003.
- Danilczyk U., Penninger J.M. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*. 98(4):463-471, 2006.
- Darimont C., Vassaux G., Ailhaud G., Negrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology*. 135(5):2030-2036, 1994.
- DeGasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W. Unger T. International Union of Pharmacology XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 52(3):415-472, 2000.
- Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart RE., Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 87(5):E1-E9, 2000.
- Dunning B.E., Gerich J.E. The role of α -cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocrine Review*. 28(3):253-283, 2007.
- Engeli S., Schling P., Gorzelniak K., Boschmann M., Janke J., Ailhaud G., Teboul M., Massiera F., Sharma A.M. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 35(6):807-825, 2003.
- English V., Cassis L. Facilitation of sympathetic neurotransmission contributes to angiotensin regulation of body weight. *J Neural Transm*. 106(7-8):631-644, 1999.
- Faria-Silva R., Duarte F.V., Santos R.A.S. Short-term angiotensin-(1-7) receptor Mas stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension*. 46(4):948-952, 2005.
- Ferrario C.M., Chappel M.C., Dean R.H., Iyer S.N. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function and natriuresis. *J Am Soc Nephrol*. 9(9):1716-1722, 1998.
- Ferrario C.M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Angiotensin-(1-7). An Evolving Story in Cardiovascular Regulation. *Hypertension*. 47(3):515-521, 2006.

Ferreira M.L. Efeito da angiotensina II na lipogênese e lipólise, *in vivo*, em ratos aclimatados ao frio (5° C) e a temperatura ambiente (25° C). Tese de doutorado – Departamento de Fisiologia e Biofísica – UFMG, 2004.

Ferreira A.J., Santos R.A.S., Almeida A.P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 38(3 Pt 2):665-668, 2001.

Fucks S., Xiao H.D., Hubert C., Michaud A., Campbell D.J., Adams J.W., Capecchi M.R., Corvol P., Bernstein K.E. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage *in vivo*. *Hypertension*. 51(2):267-274, 2008.

Gallinat S., Busche S., Raizada M.K., Summers C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278(3) E357-E374, 2000.

Giacchetti G., Faloia E., Mariniello B., Sardu C., Gatti C., Camilloni M.A., Guerrieri M., Mantero F. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens*. 15(5):381-388, 2002.

Giacchetti G., Sechi L.A., Rilli S., Carey R.M. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in End and Metab*. 16(3):120-126, 2005.

Giani J.F., Gironacci M.M., Muñoz M.C., Peña C., Turyn D., Dominici F.P. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and AKT in rat heart *in vivo*: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(2):H1154-H1163, 2007.

Giani J.F., Mayer M.A., Muñoz M.C., Silberman E.A., Hocht C., Tiara C.A., Gironacci M.M., Turyn D., Dominici F.P. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metabol*. 296(2):E262-E271, 2009.

Ginsberg H.N., Zhang Y., Hernandez-Ono A. Metabolic syndrome: Focus on dyslipidemia. *Obesity*. 14(suppl 1):41S-49S, 2006.

Gironacci M.M., Valera M.S., Yujnovsky I., Pena C. Angiotensin-(1-7) inhibitory mechanism of norepinephrine release in hipertensive rats. *Hypertension*. 44(5):783-787, 2004.

Grady E.F., Sechi L.A., Griffin C.A., Schambelan M., Kalinyak J.E. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest*. 88(3):921-933, 1991.

Gravholt C.H., Moller N., Jensen M.D., Christiansen J.S., Schmitz O. Physiological levels of glucagon do not influence lypolysis in abdominal adipose tissue as assessed by microdialysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(5):2085-2089, 2001.

Griendling K.K., Murphy T.J., Alexander R.W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 87(6):1816-1828, 1993.

- Grisé C., Boucher R., Thibault G., Genest J. Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. *Can J Biochem.* 59(4):250-255, 1981.
- Gross F., Schaechtelin G., Brunner H., Peters G. The role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and kidney function. *Canad Med Ass J.* 90: 258-262, 1964.
- Grundy S.M., Hansen B., Smith S.C., Cleeman J.I., Kahn R.A. Clinical Management of Metabolic Syndrome. *Circulation.* 109(4):551-556, 2004.
- Gurley S.B., Allred A., Le T.H., Griffiths R., Mao L., Philip N., Haystead T.A., Donoghue M., Breitbart R.E., Acton S.L., Rockman H.A., Coffman T.M. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE-null mice. *J Clin Invest.* 116(8):2218-2225, 2006.
- Hainault I., Nebout G., Turban S., Ardouin B., Ferré P., Quignard-Boulangé A. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282(1):E59-E66, 2002.
- Haluzik M., Colombo C., Gavrilova O., Chua S., Wolf N., Chen M., Stannard B., Dietz K. R., Roith D. L., Reitman M. L. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology.* 145(7):3258-3264, 2004.
- Handa R.K. et al. Autoradiographic analysis and regulation of angiotensin receptor subtypes AT(4), AT(1) and AT(1-7) in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281(5):F936-F947, 2001.
- Hansen P.B., Yang T., Huang Y., Mizel D., Briggs J., Schnermann J. Plasma renin in mice with one or two rennin genes. *Acta Physiol Scand.* 181(4):431-437, 2004.
- Hartner A., Cordasic N., Klanke B., Veelken R., Hilgers K.F. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 18(10):1999-2004, 2003.
- Heckemeyer C.M., Barker J., Duckworth W.C., Solomon S.S. Studies of the biological effect and degradation of glucagon in the rat perfused isolated adipose cell. *Endocrinology.* 113(1):270-276, 1983.
- Heitsch H., Brovkovychs S., Malinsk T., Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension.* 37(1):72-76, 2001.
- Hsu Su-Ming, Raine L., Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 29(4):577-580, 1981.

- Janke J., Engeli S., Gorzelniak K., Luft F. C., Sharma A. M. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*. 51(6):1699-1707, 2002.
- Jayasooriya A.P., Mathai M.L., Walker L.L., Begg D.P., Denton D.A., Cameron-Smith D., Egan G.F., McKinley M.J., Rodger P.D., Sinclair A.J., Wark J.D., Weisinger H.S., Jois M., Weisinger R.S. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *PNAS*. 105(8):6531-6536, 2008.
- Jurkovicová D., Dobesová Z., Kunes J., Krizanová O. Different expression of renin-angiotensin system components in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res*. 50(1):35-42, 2001.
- Keidar S., Kaplan M., Gamliel-Lazarovici A. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin-(1-7). *Cardiovascular Research*. 73(3):463-469, 2006.
- Kim S., Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 52(1):11-34, 2000.
- Kim J., Montagnani M., Koh K.K., Quon M.J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 113(15):1888-1904, 2006.
- Kouyama R., Suganami T., Nishida J., Tanaka M., Toyoda T., Kiso M., Chiwata T., Miyamoto Y., Yoshimasa Y., Fukamizu A., Horiuchi M., Hirata Y., Ogawa Y. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology*. 146(8):3481-3489, 2005.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.
- Lau T., Carlsson P.O., Leung P.S. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia*. 47(2):240-248, 2004.
- Lentz K.E., Skeggs T., Woods K.R., Kahn J.R., Shumway N.P. The amino acid composition of hypertensin I and its biochemical relationship to hypertensin II. *J Exp Med*. 104(2): 183-191, 1956.
- Lewis G.F., Carpentier A., Adeli K., Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 23(2):201-229, 2002.
- Marrero M.B., Fulton D., Stepp D., Stern D.M. Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(11):2009-2013, 2004.

- Massiéra F., Bloch-Faure M., Ceiler D., Murakami K., Fukamizu A., Gasc J-M., Quignard-Bulangé A., Negrel R., Ailhaud G., Seydoux J., Meneton P., Teboul M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *The FASEB Journal*. 15(14):2727-2729, 2001.
- Mazzolai L., Nussberger J., Aubert J.F., Brunner D.B., Gabbiani G., Brunner H.R., Pedrazzini T. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*. 31(6):1324-1330, 1998.
- Miyata N., Park F., Li X.F., Cowley A.W. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*. 277(3 Pt 2): F437-F446, 1999.
- Mizuno M., Sada T., Kato M., Koike H. Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in an animal model of type 2. *Hypertens Res*. 25(2):271-278, 2002.
- Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. 43: 533-549, 2000.
- Perea A., Clemente F., Martinell J., Villanueva-Penacarrillo M.L., Valverde I. Physiological effect of glucagon in human isolated adipocytes. *Horm Metab Res*. 27(8):372-375, 1995.
- Pinheiro S.V., Ferreira A.J., Kitten G.T., Silveira K.D., Silva D.A., Santos S.H.S., Gava E., Castro C.H., Magalhães J.A., Mota R.K., Botelho-Santos G.A., Bader M., Alenina N., Santos R.A.S., Simões e Silva A.C. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney International*. 75(11):1184:1193, 2009.
- Prasad A., Quyyumi A.A. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor in the metabolic syndrome. *Circulation*. 110(11):1507-1512, 2004.
- Ptáfl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29(9):e45, 2001
- Rabelo L.A., Xu P., Todiras M., Sampaio W.O., Butteries J., Bader M., Santos R.A.S., Alenina N. Ablation of angiotensin-(1-7) receptor Mas in C57BL/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens*. 2(6):418-424, 2008.
- Ran J., Hirano T., Adachi M. Angiotensin II type I receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 287(2):E227-E232, 2004.
- Ren Y., Garvin J. L., Carretero A. O. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 39(3):799-802, 2002.

- Saint-Marc P., Kozak L.P., Ailhaud G., Darimont C., Negrel R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology*. 142(1):487-492, 2001.
- Sampaio W.O., Nascimento A.A., Santos R.A.S. Systemic and regional hemodynamics effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol*. 284(6):H1985-H1994, 2003.
- Sampaio W.O., Santos R.A.S., Faria-Silva R., Machado L.T.M., Schiffrin E.L., Touyz R.M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 49(1):185-192, 2007.
- Sánchez-Capelo. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytocine & Growth Factor Reviews*. 16:15-34, 2005.
- Santos R.A., Brosnihan K.B., Chappell M.C., Pesquero J., Chernicky C.L., Greene L.J. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brain system. *Hypertension*. 11(2 Pt 2):I153-I157, 1988.
- Santos R.A.S., Simões e Silva A.C., Khosla M.C., Magaldi A.J., Passaglio K.T., Cesar K.R., Baracho N.C.V. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. 27:875-884, 1996.
- Santos R.A.S., Campagnole-Santos M.J., Andrade S.P. Angiotensin-(1-7): na update. *Regul Pept*. 91(1-3):45-62, 2000.
- Santos R.A.S., Simões e Silva A.C., Maric C., Silva D.M.R., Machado R.P., Buhr I., Heringer-Walther S., Pinheiro S.V.B., Lopes M.T., Bader M., Mendes E.P., Lemos V.S., Campagnole-Santos M.J., Schultheiss H., Steph R., Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci*. 100(14):8258-8263, 2003.
- Santos R.A., Frézard F., Ferreira A.J. Angiotensin-(1-7): blood, heart and blood vessels. *Curr Med Chem*. 3(4):383-391, 2005.
- Santos R.A.S., Ferreira A.J., Pinheiro S.V.B., Sampaio W.O., Touyz R., Campagnole-Santos J.C. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 14(8): 1019-1031, 2005.
- Santos R.A.S., Castro C.H., Gava E., Pinheiro S.V.B., Almeida A.P., de Paula R.D., Cruz J.S., Ramos A.S., Rosa K.T., Irigoyen M.C., Bader M., Alenina N., Kitten G.T., Ferreria A.J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension*. 47(5): 996-1002, 2006.
- Santos R.A.S., Ferreira A.J., Simões e Silva A.C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-mas axis. *Exp Physiol*. 93(5):519-527, 2008.

- Santos S.H., Fernandes L.R., Mario E.G., Ferreira A.V., Pôrto L.C., Alvarez-Leite J.I., Botion L.M., Bader M., Alenina N., Santos R.A.S. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 57(2):340-347, 2008.
- Schiavone M.T., Santos R.A.S., Brosnihan K.B., Khosla M.C., Ferrario C.M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci*. 85(11):4095-4098, 1988.
- Sharma A.M., Janke J., Gorzelniak K., Engeli S., Luft F.C. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension*. 40(5):609-611, 2002.
- Sharma A.M., Chetty V.T. Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetol*. 42 Suppl 1:S3-S8, 2005.
- Shimazu T. Innervation of the liver and gluco-regulation: role of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition*. 12(1):65-66, 1996.
- Fraga-Silva R.A., Pinheiro S.V., Gonçalves A.C., Alenina N., Bader M., Santos R.A. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Molecular Medicine*. 14(1-2):28-35, 2008.
- Strazzullo P., Galletti F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. *Cur Opin in Nephrol and Hyp*. 13(3):325-332, 2004.
- Tallant E.A., Clark M.A. Molecular Mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 42(4):574-579, 2003.
- Timmermans P.B.M.W.M., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Benfield P., Carini D.J., Lee R.J., Wexler R.R., Saye J.A.M., Smith R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacology Review*. 45(2):205-251, 1993.
- Tipins S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G., Turner A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(43):33238-33243, 2000.
- Touyz R.M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodeling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol*. 90(4):449-455, 2005.
- Urata H., Nishimura H., Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming system in humans. *Am J Hypertens*. 9(3):277-284, 1996.
- Vickers C., Hales P., Kaushik V., Dick L., Gavin J., Tang J., Godbout K., Parsons T., Baronas E., Hsieh F., Acton S., Patane M., Nichols A., Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 277(17):14838-14843, 2002.

Wang C.C., Goalstone M.L., Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 53(11):2735-2740, 2004.

Wather T., Balschun D., Voight J.P., Fink H., Zuschratter W., Birchmeier C., Ganten D., Bader M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the mas protooncogene. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(19): 11867-11873, 1998.

Walther T., Wessel N., Kang N., Sander A., Tschöpe C., Malberg H., Bader M., Voss A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking Mas protooncogene. *Braz J Med Biol Res*. 33(1):1-9, 2000.

Wei Y., Sowers J. R., Nistala R., Gong H., Uptergrove G. M.-E., Clark S. E., Morris E. M. Szary N., Manrique C., Stump C. S. Angiotensin II-induced NAD(P)H oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(46):35137-35146, 2006.

Wu L., Iwai M., Nakagami H., Li Z., Chen R., Suzuki J., Akishita M., de Gasparo M., Horiuchi M. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation*. 104(22): 2716–21, 2001.

Li X.C., Liao T., Zhuo J.L. Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of type 2 diabetes in mice. *Clinical Science*. 114:591-601, 2008.

Xu P., Gonçalves A.C.C., Todiras M., Rabelo L.A., Sampaio W.O., Moura M.M., Santos S.S., Luft F.C., Bader M., Gross V., Alenina N., Santos, R.A.S. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in Mas gene-deleted mice. *Hypertension*. 51(part 2): 574-580, 2008.

Yound D., Waitches G., Birchmeier C., Fasano O., Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 45(5):711-719, 1986.

Yudkin J.S. Inflammation, obesity and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 39(10):707-709, 2007.

Yvan-Charvet L., Even P., Bloch-Faure M., Guerre-Millo M., Moustaid-Moussa N., Ferre P., Quignard-Boulangé A. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 54(4):991-999, 2005.

Zhou Y., Chen Y., Dirksen W. P., Morris M., Periasamy M. AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. *Circ Res*. 28(93): 1089-1094, 2003.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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