

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **TESE DE DOUTORADO**

**Avaliação do papel do eixo Angiotensina-(1-7)/Mas no  
metabolismo lipídico e glicêmico, utilizando modelos de  
ratos geneticamente modificados**

Tese de doutorado apresentada ao programa  
de Pós-graduação em Ciências Biológicas –  
Fisiologia e Farmacologia da Universidade  
Federal de Minas Gerais

**Aluno: Sérgio Henrique Sousa Santos**

**Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos  
Santos**

**Belo Horizonte, 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITOR: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA: Profa. Heloisa Starling

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

PRÓ-REITOR: Prof. Elizabeth Ribeiro da Silva

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DIRETORA: Profa. Maria Cristina Lima de Castro

VICE-DIRETOR: Prof. Sérgio Costa Oliveira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**

**FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

COORDENADOR: Prof. Frederic J.J. Frezard

SUB-COORDENADOR: Profa. Maria José Campagnole dos Santos

## Mensagem

Esse é um texto que me inspira e direciona em momentos de escolhas e indecisões:

"Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez é a desilusão de um quase.

É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata trazendo tudo que poderia ter sido e não foi.

Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda, quem quase morreu está vivo, quem quase amou não amou.

Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se perdem por medo, nas idéias que nunca sairão do papel por essa maldita mania de viver no outono.

Pergunto-me, às vezes, o que nos leva a escolher uma vida morna; ou melhor não me pergunto, contesto. A resposta eu sei de cór, está estampada na distância e frieza dos sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença dos "Bom dia", quase que sussurrados. Sobra covardia e falta coragem até pra ser feliz.

A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai.

Talvez esses fossem bons motivos para decidir entre a alegria e a dor, sentir o nada, mas não são. Se a virtude estivesse mesmo no meio termo, o mar não teria ondas, os dias seriam nublados e o arco-íris em tons de cinza.

O nada não ilumina, não inspira, não aflige nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Não é que fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao alcance, para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência porém, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer.

Pros erros há perdão; pros fracassos, chance; pros amores impossíveis, tempo.

De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma. Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance.

Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.

Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

(Autoria atribuída a *Luís Fernando Veríssimo*, mas que ele mesmo diz ser de *Sarah Westphal Batista da Silva*, em sua coluna do dia 31 de março de 2005 do jornal *O Globo*)

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por me proporcionar tantas graças e perdoar minhas faltas. Tenho certeza que minhas conquistas não vieram apenas por meus méritos e virtudes, mas sim por sua bondade e misericórdia.

Aos meus pais, Celso Ciríaco dos Santos e Sônia Sousa Santos, que apesar de todas as dificuldades priorizaram os estudos dos filhos e assim possibilitaram essa vitória. Vocês sabem o quanto os amo. Dedico cada conquista ao esforço e zelo que têm tido por todos esses anos.

Obrigado às minhas irmãs Caroline e Cinara, minha avó, tios, primos e amigos que torceram por mim e rezaram para que meus sonhos se realizassem. Cada um sabe sua importância nessa conquista

Obrigado ao meu orientador Robson Santos pela conduta e ensinamentos que só um grande mestre e pesquisador poderia ter oferecido.

Obrigado Tati, Tici, Tatá, Maria José, Jeff, e meus colegas de laboratório e da faculdade de farmácia, pela força, auxílio e incentivo oferecidos por todos esses anos na UFMG.

A todos vocês o meu muito obrigado.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota” (Theodore Roosevelt).

“Quando alguém encontra seu caminho, precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas utilizadas para mostrar a entrada” (Paulo Coelho).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio financeiro da FAPEMIG, CAPES (PROBRAL), CNPq e PRONEX – FAPEMIG/CNPq.

## Sumário

|   |              |
|---|--------------|
| <b>Agradecimentos.....</b>                                      | <i>iv</i>    |
| <b>Lista de Tabelas e Figuras.....</b>                          | <i>xii</i>   |
| <b>Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas Químicas.....</b> | <i>xiii</i>  |
| <b>Resumo.....</b>  | <i>xviii</i> |
| <b>Abstract.....</b>  | <i>xxi</i>   |
| <b>1- Introdução.....</b>                                       | 1            |
| <b>2- Revisão Bibliográfica.....</b>                            | 1            |
| 2.1 Síndrome Metabólica.....                                    | 1            |
| 2.1.1 Hipertensão Arterial.....                                 | 2            |
| 2.1.2 Obesidade.....  | 3            |
| 2.1.3 Resistência à Insulina/ Diabetes Melito Tipo 2.....       | 4            |
| 2.1.4 Dislipidemia.....   | 5            |
| 2.2 Adipocinas.....   | 7            |
| 2.2.1 Leptina.....  | 8            |
| 2.2.2 Resistina.....  | 11           |
| 2.2.3 Adiponectina.....   | 12           |
| 2.3 Sistema Renina-Angiotensina.....                            | 14           |
| 2.3.1 Angiotensina II.....                                      | 15           |
| 2.3.2 Angiotensina-(1-7).....                                   | 17           |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.3 Camundongo knockout <i>Mas</i> .....                                | 22        |
| 2.3.4 Interação do sistema renina-angiotensina com metabolismo..          | 25        |
| 2.3.5 Mecanismos moleculares podem correlacionar o SRA à SM..             | 29        |
| 2.4 Ratos Transgênicos TGR-L3292 e TetO-L8429                             | 30        |
| 2.5 Primeira Etapa- Avaliação metabólica do camundongo <i>Mas</i> -KO.... | 32        |
| <b>3- Objetivo.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4- Materiais e Métodos.....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1 Drogas utilizadas no tratamento.....                                  | 38        |
| 4.2 Animais.....  | 38        |
| 4.3 Tratamento.....   | 39        |
| 4.4 Amostras de sangue.....   | 40        |
| 4.5 Peso Corporal e peso adiposo.....                                     | 41        |
| 4.6 Ingestão alimentar, consumo de água e diurese.....                    | 41        |
| 4.7 Determinação dos níveis plasmáticos de leptina e adiponectina.....    | 41        |
| 4.8 Determinação dos níveis de colesterol total.....                      | 42        |
| 4.9 Determinação de colesterol HDL.....                                   | 42        |
| 4.10 Determinação dos níveis de triglicerídeos.....                       | 43        |
| 4.11 Histologia de tecido adiposo e renal.....                            | 43        |
| 4.12 Retrotranscrição e Real Time PCR.....                                | 44        |
| 4.12.1 Extração de RNA total.....   | 44        |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.12.2 | Eliminação de moléculas de DNA genômico.....                   | 45 |
| 4.12.3 | Quantificação do RNA total.....                                | 45 |
| 4.12.4 | RT (Transcrição Reversa).....                                  | 46 |
| 4.12.5 | PCR Quantitativa.....  | 46 |
| 4.13   | Extração de proteínas totais.....                              | 47 |
| 4.14   | Western Blotting.....  | 48 |
| 4.15   | Testes de Tolerância à Glicose e Sensibilidade Insulínica..... | 49 |
| 4.16   | Captação de Glicose.....                                       | 50 |
| 4.17   | Glicogênio Muscular.....                                       | 51 |
| 4.15   | Análises estatísticas e expressão dos resultados.....          | 52 |
| 5-     | <b>Resultados</b> .....  | 53 |
| 5.1    | Ratos TGR-L3292.....   | 54 |
| 5.1.1  | Peso corporal e peso adiposo.....                              | 54 |
| 5.1.2  | Ingestão alimentar.....  | 55 |
| 5.1.3  | Histologia do tecido adiposo epididimal.....                   | 56 |
| 5.1.4  | Perfil Lipídico.....   | 57 |
| 5.1.5  | Perfil Glicêmico.....  | 58 |
| 5.1.6  | Western Blotting do receptor Glut4 do tecido adiposo .....     | 60 |
| 5.1.7  | Dosagem dos níveis séricos de adipocinas.....                  | 61 |
| 5.1.8  | Real Time PCR do tecido adiposo.....                           | 63 |

|  |            |
|--|------------|
| 5.1.9 Glicogênio Muscular.....                                     | 64         |
| 5.2 Ratos TetO-29.....   | 65         |
| 5.2.1 Glicemia, peso corporal e consumo de água.....               | 65         |
| 5.2.2 Diurese.....   | 67         |
| 5.2.3 Sensibilidade insulínica.....                                | 68         |
| 5.2.4 Perfil Lipídico.....   | 69         |
| 5.2.5 Insulina e adipocinas.....                                   | 70         |
| 5.2.6 Western Blotting do receptor de insulina.....                | 71         |
| 5.2.7 Western Blotting para a via da Akt total e fosforilada.....  | 72         |
| 5.2.8 Western Blotting para a via da MAPK total e fosforilada..... | 73         |
| 5.2.9 Real Time PCR para o angiotensinogênio e TNF- $\alpha$ ..... | 74         |
| 5.2.10 Histologia renal - coloração hematoxilina-eosina.....       | 75         |
| 5.2.11 Histologia renal – coloração sirius red.....                | 76         |
| <b>6- Discussão.....</b>   | <b>78</b>  |
| <b>7- Conclusão.....</b>   | <b>89</b>  |
| <b>8- Referências Bibliográficas.....</b>                          | <b>91</b>  |
| <b>9- Anexos.....</b>  | <b>100</b> |

## Lista de Tabelas e Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Correlação entre doenças relacionadas à obesidade e distúrbios metabólicos.....                      | 3  |
| <b>Tabela 2:</b> Primers e condições experimentais utilizadas para Real Time PCR..                                    | 47 |
| <b>Figura 1–</b> Esquema representativo do mecanismo hipotético de regulação da leptina.....                          | 10 |
| <b>Figura 2–</b> Visão atual dos principais componentes do sistema renina-angiotensina.....                           | 15 |
| <b>Figura 3–</b> Alterações patofisiológicas associadas com a ativação do SRA do tecido adiposo na obesidade.....     | 28 |
| <b>Figura 4 –</b> Peso corporal e peso do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos animais TGR-L3292 e SD..... | 54 |
| <b>Figura 5 –</b> Massa de comida ingerida corrigida pelo peso corporal dos animais TGR-L3292 e SD.....               | 55 |
| <b>Figura 6 –</b> Análise histológica (HE) do tecido adiposo epididimal dos animais TGR-L3292 e SD.....               | 56 |
| <b>Figura 7 –</b> Perfil lipídico dos ratos TGR-L3292 e SD.....   | 57 |
| <b>Figura 8 –</b> Perfil glicêmico dos ratos TGR-L3292 e SD.....  | 59 |
| <b>Figura 9 –</b> Western Blotting de amostras de tecido adiposo epididimal de ratos TGR-L3292 e SD.....              | 60 |
| <b>Figura 10 –</b> Níveis plasmáticos de leptina e adiponectina nos ratos TGR-L3292 e SD.....                         | 62 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 11</b> – Análise por PCR em tempo real do RNA extraído do tecido adiposo epididimal de ratos TGR-L3292 e SD.....      | 63 |
| <b>Figura 12</b> – Análise dos níveis de glicogênio no músculo esquelético de ratos TGR-L3292 e SD.....                         | 64 |
| <b>Figura 13</b> – Glicemia, peso corporal e consumo de água dos animais TetO-Ang-1-7 e TetO HPBCD.....                         | 66 |
| <b>Figura 14</b> – Diurese dos animais TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....   | 67 |
| <b>Figura 15</b> – Sensibilidade insulínica animais TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....  | 68 |
| <b>Figura 16</b> – Perfil lipídico dos grupos TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....  | 69 |
| <b>Figura 17</b> – Níveis circulantes de adipocinas e insulina dos grupos TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....                        | 70 |
| <b>Figura 18</b> – Receptor de insulina dos grupos SD TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD...71  |    |
| <b>Figura 19</b> – Akt total e fosforilada dos grupos TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....  | 72 |
| <b>Figura 20</b> – Erk 42/44 (MAPK) total e fosforilada dos grupos TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....                               | 73 |
| <b>Figura 21</b> – Real time PCR dos grupos TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....  | 74 |
| <b>Figura 22</b> – Análise histológica renal pela técnica de hematoxilina-eosina dos animais SD, TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD..... | 75 |
| <b>Figura 23</b> – Análise histológica renal pela técnica de sirius red dos animais SD TetO-Ang-1-7 e TetO-HPBCD.....           | 76 |

## **Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas Químicas**

A-779 = Antagonista específico do receptor Mas

Akt = protein kinases B (PKB)

AMPK = AMP-activated protein kinase

$\alpha$ -MSH = Hormônio estimulante de melanócitos

AdipoR1/2 = Receptores de adiponectina

AGT= Angiotensinogênio

Ang I = Angiotensina I

Ang II = Angiotensina II

Ang III = Angiotensina III

Ang IV = Angiotensina IV

Ang-(1-7) = Angiotensina-(1-7)

aP2 = ALBP (lipid-binding protein)

ApN = Adiponectina

AT<sub>1</sub> = Receptor tipo 1 de angiotensina II

AT<sub>2</sub> = Receptor tipo 2 de angiotensina II

B<sub>2</sub> = Receptor tipo 2 de bradicinina

C57Bl/6 = Linhagem de camundongos pretos

CART = Transcrito regulado por cocaína e anfetamina

cDNA = DNA complementar

CHO = Células de ovário de hamster chinês

CSF = Fator estimulador de colônias

CRH = Hormônio liberador de corticotropina

CV11974 = Antagonista específico do receptor AT<sub>1</sub>

CVLM = Medula ventro lateral caudal

DEPC = Dietil pirocarbonato

DM = Diabetes Melito

DNA = Ácido desoxiribonucléico (*Desoxiribonucleic Acid*)

ECA = Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 = Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA = Ácido etilenediaminotetracético

E.L.I.S.A. = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ERK = extracellular signal-regulated kinases

ET-1 = Endotelina 1

FVB/N = Linhagem de camundongos brancos

gApN = Fragmento da ApN

GLUT4 = Transportador de glicose do tipo 4

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL = Lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

HE = Hematoxilina e Eosina

HOE-140 = Antagonista específico do receptor B<sub>2</sub>

ICAM-1 = Molécula de adesão intercelular 1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*)

iECA = Inibidor da ECA

IFN = Interferons

IL = Interleucinas

IMC = Índice de massa corpórea

IRS-1 = Substrato do Receptor de Insulina 1

KO = Animal com deleção genética de um determinado gene (*Knockout*)

LDL = Lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)

MAPK = Mitogen-activated protein kinase

Mas = Receptor específico da Angiotensina-(1-7)

mRNA = RNA mensageiro

NADPH = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NEP = Endopeptidase Neutra

NF- $\kappa$ B = Fator nuclear  $\kappa$ B

NO = Óxido Nítrico

NPY = Neuropeptídeo Y

ob = Gene da obesidade

PCP = Prolil-Carboxipeptidase

PCR = Reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

PD123319 = Antagonista específico do receptor AT<sub>2</sub>

PEP = Prolil-Endopeptidase Neutra

PG = Prostaglandinas

PGI<sub>2</sub> = Prostaciclina

pH = Potencial hidrogeniônico

PI3K = Phosphoinositide 3-kinases

PKA = Proteína quinase A

PKB = Proteína quinase B



PKC = Proteína quinase C

POMC = Proopiomelanocortina

PPAR- $\alpha$  = Receptores nucleares alfa ativados por proliferadores de peroxissomas

PPAR- $\gamma$  = Receptores nucleares gama ativados por proliferadores de peroxissomas

RNA = Ácido Ribonucléico

SD = Sprague Dawley

shRNA = short hairpin RNA

SM = Síndrome Metabólica

SNS = Sistema Nervoso Simpático

SRA = Sistema Renina-Angiotensina

RI = Resistência a Insulina

RNA = Ácido ribonucléico (*RiboNucleic Acid*)

RNA<sub>m</sub> = RNA mensageiro

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

RPM = Rotações por minuto

RT = Transcrição reversa (*reverse transcription*)

RVLM = Medula ventro lateral rostral

TBS-T = Tris-Base com Tween

TetO = tetracycline operator site

TGF- $\beta$  = Fator de transformação de crescimento  $\beta$

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

VCAM-1 = Molécula de adesão da célula vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

VLDL = Lipoproteína de muita baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*)

WT = Selvagem/Controle (*Wild Type*)

$\mu\text{g}$  = Micrograma

$\mu\text{L}$  = Microlitros

$\mu\text{m}$  = Micrômetros

## Resumo

O diabetes melito tipo 2 e a obesidade continuam sendo dois dos principais problemas de saúde no mundo e a sua prevalência está aumentando. É sabido que a angiotensina II está diretamente envolvida em diferentes desordens metabólicas incluindo o diabetes. Por outro lado o papel metabólico da angiotensina-(1-7), um importante peptídeo contraregulatório dentro do sistema renina-angiotensina, apenas começou a ser investigado. Nesse contexto, os principais objetivos desse estudo foram avaliar o efeito da administração oral da angiotensina-(1-7) em um rato transgênico que representa um novo modelo de diabetes melito do tipo 2 induzível, e avaliar o metabolismo lipídico e glicêmico em ratos transgênicos que expressam uma proteína de fusão de liberação de angiotensina-(1-7), TGR(A1-7)3292 (TGR-L3292) que apresentam aumento plasmático crônico desse peptídeo.

Os ratos transgênicos com downregulation induzível do receptor de insulina baseado no shRNA, foram tratados com doxaciclina para induzir diabetes. Eles foram divididos em dois grupos, um tratado com angiotensina-(1-7) e outro tratado apenas com o veículo. Para o tratamento uma formulação oral especial de angiotensina-(1-7) incluída em  $\beta$ -ciclodextrina foi utilizada. Durante o início do estado diabético (estudo preventivo) uma dose mais baixa de angiotensina-(1-7) (30  $\mu$ g/Kg PC) foi administrada, sendo aumentada para 100  $\mu$ g/ Kg PC quando o estado diabético nos ratos estava completamente estabelecido (estudo terapêutico) totalizando 72 dias de tratamento continuado. Em ambas as concentrações o teste de sensibilidade insulínica foi realizado. O peso corporal, volume de ingestão de água e a glicemia foram medidos diariamente. Ao término dos experimentos foram analisados os níveis plasmáticos de lipídeos, leptina, adiponectina, insulina e diurese. A nefropatia diabética foi avaliada por histologia e métodos de coloração. Para explicar os mecanismos envolvidos nos achados fisiológicos realizamos Western blotting para Total/Phospho Akt; Total/Phospho Erk1/2-MAPK e para o receptor de insulina no músculo esquelético e tecido adiposo epididimal. A expressão de angiotensinogênio e TNF- $\alpha$  foram também avaliados por Real Time PCR nos mesmos tecidos.

Nos animais TGR-L3292 e SD analisamos os níveis plasmáticos de lipídeos, insulina e adipocinas. Testes de tolerância a glicose e sensibilidade insulínica foram realizados e também a dosagem de glicogênio muscular. A captação de 2-deoxy-[<sup>3</sup>H]glicose pelos adipócitos foi utilizada para determinar a taxa de transporte de glicose. Quantificamos por Western blotting no tecido adiposo os níveis de GLUT4, Akt total e fosforilada. A expressão gênica do TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , adiponectina, aP2 e angiotensinogênio foram medidos por real time PCR.

Observamos que o tratamento dos ratos diabéticos com a menor dose de angiotensina-(1-7), antes do estabelecimento do quadro de diabetes, reduziu a glicemia em aproximadamente 50%. Quando o quadro de hiperglicemia estava completamente instalado a maior dose do peptídeo foi novamente capaz de diminuir os níveis circulantes de glicose para metade do valor. Em ambas as situações os animais tratados com angiotensina-(1-7) apresentaram aumento da sensibilidade insulínica, diminuição da ingestão de água e da perda de peso corporal seguida por redução da diurese. No plasma, o tratamento reduziu os níveis de insulina e colesterol LDL além de aumentar os níveis de colesterol HDL e adiponectina. A histologia renal revelou uma marcante redução de infiltrado intracelular e fibrose. Os mecanismos envolvidos parecem estar relacionados com um aumento da ativação da via da Akt e atenuação da via da MAPK associados com diminuição da expressão de angiotensinogênio e TNF- $\alpha$ . A expressão do receptor de insulina não foi alterada pelo tratamento oral no fígado, músculo e tecido adiposo.

Os ratos TGR-L3292 apresentaram diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol seguido do aumento dos níveis a circulantes de adiponectina, e diminuição da massa de tecido adiposo abdominal. Além disso, o nível elevado de angiotensina-(1-7) aumentou a tolerância à glicose e a sensibilidade insulínica bem como aumentou a captação de glicose estimulada pela insulina nos adipócitos. Esses resultados foram acompanhados por um aumento nos níveis de Akt no tecido adiposo. Os ratos TGR-L3292 apresentaram níveis normais de glicogênio muscular, enquanto a expressão de angiotensinogênio foi

significativamente diminuída no tecido adiposo com aumento da expressão do gene aP2.

Em síntese, este estudo mostrou que a administração da formulação oral de angiotensina-(1-7) reverteu o quadro de hiperglicemia e suas conseqüências no modelo de diabetes do tipo 2 e que os ratos TGR-L3292, que possuem aumento crônico de angiotensina-(1-7), apresentaram melhora do perfil lipídico e glicêmico. Esses dados possuem fortes implicações clínicas e indicam que estratégias farmacológicas que levem ao aumento crônico dos níveis de Ang-(1-7) podem prevenir ou determinar atenuação das desordens metabólicas presentes no diabetes e síndrome metabólica.

## Abstract

Type 2 diabetes and obesity are still two of the largest health problems in the world and its prevalence is increasing. It is known that angiotensin II is involved in different metabolic disorders including diabetes. On the other hand, the metabolic role of angiotensin-(1-7), an important counterregulatory peptide in the renin-angiotensin system, was just started to be investigated. In the present study we evaluated the effect of oral administration of angiotensin-(1-7) in a novel transgenic rat model with inducible diabetes mellitus type 2 and evaluate the effect of increased angiotensin-(1-7) plasma levels in lipid and glucose metabolism using transgenic rats which express an angiotensin-(1-7) releasing fusion protein, TGR(A1-7)3292 (TGR-L3292).

Transgenic rats with inducible shRNA-based insulin receptor downregulation were treated with doxycyclin to induce diabetes. They were divided in two groups, one treated with angiotensin-(1-7) and the other treated only with vehicle. For the treatment a special oral formulation of angiotensin-(1-7) included in  $\beta$ -cyclodextrin was used. During the onset of diabetes (prevention study) a low dose of angiotensin-(1-7) (30  $\mu\text{g}/\text{Kg BW}$ ) was administered orally, which was increased to 100  $\mu\text{g}/\text{Kg BW}$  when given to fully diabetic rats (therapeutic study) and lasted for a total of 72 days. At both concentrations insulin sensitivity tests were performed. Body weight, drink volume and glycemia were measured daily. At the end of the experiment we analyzed diuresis, and the plasma levels of lipids, leptin, adiponectin and insulin. Diabetic nephropathy was evaluated by histological evaluation of the kidney. In addition we performed Western blotting for Total/Phospho Akt; Total/Phospho Erk1/2-MAPK and insulin receptor in muscle and adipose tissue. The expression of angiotensinogen and TNF- $\alpha$  were also evaluated by Real Time PCR in muscle and adipose tissue. Plasma lipids, insulin and adipokine concentrations were measured in TGR-L3292 and SD rats. A glucose-tolerance and insulin sensitivity test was performed. Muscle glycogen content was analyzed. Uptake of 2-deoxy- $^3\text{H}$ glucose by adipocytes was used to determine the rate of glucose transport and adipose tissue GLUT4, total and phosphorylated Akt were quantified by Western blotting. Gene expression of

TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , adiponectin, aP2 and angiotensinogen were measured by real time PCR.

We observed that treatment with the lower dose of angiotensin-(1-7) before the onset of diabetes reduced glycemia by approximately 50%. When hyperglycemia was already manifested the high dose decreased blood glucose levels again to half of the control values. In both situations the angiotensin-(1-7) treated animals presented increased insulin sensitivity, reduced drinking volume and body weight losses, followed by decreased diuresis. The treatment reduced insulin, LDL cholesterol and enhanced HDL cholesterol, as well as, adiponectin levels in plasma. Kidney histology revealed a marked decrease in cellular infiltration and fibrosis. The mechanisms involved seems to be related to an increased activation of the Akt and an attenuated MAPK pathway associated with a decreased expression of angiotensinogen and TNF-  $\alpha$ . Insulin receptor expression was not altered by the treatment in liver, muscle, and adipose tissue.

The TGR-L3292 rats presented decreased triglycerides and cholesterol levels, increased plasma adiponectin, and decreased abdominal fat mass. In addition, the increased angiotensin-(1-7) levels induced enhanced glucose tolerance and insulin sensitivity, as well as, a more pronounced insulin-stimulated glucose uptake by adipocytes accompanied by increased Akt content in adipose tissue. TGR-L3292 exhibited normal muscle glycogen while angiotensinogen expression was markedly decreased in adipose tissue with increased aP2 expression

In summary, this study showed that an oral angiotensin-(1-7) formulation reverses hyperglycemia and its consequences in a chronic type 2 diabetes model. In addition, the chronic increase in angiotensin-(1-7) levels of TGR-L3292 leads to prominent changes in glucose and lipid metabolism without any sign of tachyphylaxis. These data have strong implications for the treatment of human metabolic disorders and make angiotensin-(1-7) as a potential drug to treat diabetes and the metabolic syndrome.

## ***INTRODUÇÃO***

---



## **1- INTRODUÇÃO**

A síndrome metabólica (SM) representa um quadro de alterações metabólicas complexas, que envolvem a coexistência variável de resistência à insulina com intolerância a glicose, aumento nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, hipertensão e obesidade. Dentre estas alterações se destaca o quadro de diabetes melito do tipo 2 e a obesidade, que são os achados mais comuns. Acredita-se que o desequilíbrio do sistema renina-angiotensina (SRA) exerça um papel importante no desencadeamento dessa síndrome.

Estudos recentes mostram o SRA não apenas como um regulador da pressão arterial e homeostasia cardiovascular, mas também como um complexo sistema hormonal envolvido nas mais diversas funções no organismo. Dois importantes efetores desse sistema são a angiotensina II (Ang II) e o heptapeptídeo angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. A Ang-(1-7), apresenta uma série de ações antagônicas às da Ang II, tanto em estados fisiológicos quanto em doenças, funcionando, assim, como um contra-regulador dentro do SRA.

São conhecidas várias interações da Ang II com a insulina e com a função endócrina do tecido adiposo. Porém não existiam estudos sobre o efeito do aumento crônico da Ang-(1-7) no metabolismo lipídico e glicêmico no estado basal ou em modelos diabéticos.

## **2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Síndrome metabólica**

A síndrome metabólica, também conhecida como síndrome de resistência à insulina, é caracterizada pela coexistência em graus variáveis de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão arterial (Grundy, Brewer et al. 2004).

Outros achados incluem estado pró-inflamatório, microalbuminúria e hipercoagulabilidade. O conjunto de fatores de risco que identificam a síndrome metabólica foi reconhecido, pela primeira vez, em 1983. Em 1988, Reaven introduziu o termo síndrome X e identificou a resistência à insulina, definida como a menor captação da glicose pelos tecidos periféricos, como o substrato fisiopatológico comum da síndrome. Outros sinônimos têm sido utilizados para denominar essa constelação de fatores de risco (dislipidemia, resistência à insulina, hipertensão e obesidade), tais como síndrome plurimetabólica, síndrome da resistência à insulina, quarteto mortal, dentre outros (Miranda, DeFronzo et al. 2005).

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu o termo unificado síndrome metabólica, pois os estudos não identificaram a presença de resistência à insulina como único fator causal de todos os componentes da síndrome. A patogênese da síndrome é multifatorial, sendo a obesidade, a vida sedentária, a dieta e a interação com fatores genéticos os responsáveis pelo aparecimento da mesma. Mutações e polimorfismos nos genes associados com a resistência à insulina, anormalidades nos adipócitos, hipertensão e alterações lipídicas ocupam papel central na etiopatogenia da síndrome (Grundy, Brewer et al. 2004; Miranda, DeFronzo et al. 2005).

### **2.1.1 Hipertensão Arterial**

O quadro de hipertensão ocorre quando os níveis da pressão arterial encontram-se acima dos valores de referência para a população em geral (Khosla and Black 2006).

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS) os valores de pressão arterial sistólica/diastólica de 120/80mmHg são considerados como pressão arterial ótima e 130/85mmHg é considerada limítrofe. Valores pressóricos superiores a 140/90mmHg são estratificados como hipertensão. Esta situação, quando estabelecida, aumenta o risco de doenças cardiovasculares futuras, como por exemplo, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, (Khosla and Black 2006).

### 2.1.2 Obesidade

Obesidade, nediaz ou pimelose (tecnicamente, do grego pimelē = gordura e ose = processo mórbido) é uma doença na qual a reserva natural de gordura aumenta até o ponto em que passa a associar-se com problemas de saúde ou ao aumento da taxa de mortalidade (Deurenberg and Yap 1999; Goebel and Schulz 2006). Apesar de se tratar de uma condição clínica individual, esta é vista, cada vez mais, como um sério e crescente problema de saúde pública. O excesso de peso predispõe o organismo a uma série de doenças ou distúrbios como os que se seguem na tabela abaixo:

**Tabela 1:** Correlação entre doenças relacionadas à obesidade e distúrbios metabólicos

| <b>Doenças</b>             | <b>Distúrbios</b>                    |
|----------------------------|--------------------------------------|
| Hipertensão arterial       | Distúrbios lipídicos                 |
| Doenças cardiovasculares   | Hipercolesterolemia                  |
| Doenças cérebro-vasculares | Diminuição de HDL ("colesterol bom") |
| Diabetes Melito tipo II    | Aumento da insulina                  |
| Câncer                     | Intolerância à glicose               |
| Osteoartrite               | Distúrbios menstruais/Infertilidade  |
| Coledocolitíase            | Apnéia do sono                       |

Assim, pacientes obesos apresentam uma diminuição significativa da sua expectativa de vida, principalmente quando são portadores de obesidade mórbida.

### **2.1.3 Resistência a Insulina/Diabetes Melito Tipo 2**

O diabetes não é uma doença única e sim um grupo heterogêneo de síndromes caracterizadas por uma elevação dos níveis glicêmicos devido a uma deficiência relativa ou absoluta de insulina que compromete também o metabolismo lipídico e protéico (Targher, Bertolini et al. 2006). Ainda hoje, o diabetes melito é a principal causa de cegueira e amputação no adulto e uma importante causa de falha renal, problemas cardíacos e acidentes vasculares (Kabakov, Norymberg et al. 2006). Os casos de diabetes melito podem ser divididos, em sua maioria, em dois grupos: tipo 1 (inicialmente denominado insulina-dependente) e tipo 2 (inicialmente denominado insulina-independente). A incidência do tipo 2 está aumentando em função do envelhecimento da população e de um aumento na prevalência da obesidade e do estilo de vida sedentário. Esse aumento se torna mais perturbador considerando-se o aumento do diabetes tipo 2 em crianças (Champe 2006). Associa-se o diabetes melito do tipo 2 com um aumento inicial da concentração plasmática de insulina, que ocorre como resposta compensatória das células beta do pâncreas em decorrência à diminuição da utilização e armazenamento dos carboidratos e a conseqüente elevação da taxa de glicemia, tendo como conseqüência o desenvolvimento de hiperglicemia (Guyton 2006). O não tratamento da doença com o aumento crônico da glicose plasmática gera lesão das células beta pancreáticas levando a uma deficiência na produção de insulina.

Algumas vezes esse tipo de diabetes se desenvolve sem sintomas óbvios sendo frequentemente detectada por exames de triagem de rotina. Entretanto, muitos indivíduos com diabetes tipo 2 apresentam sintomas de poliúria e polidipsia de várias semanas de duração. Os pacientes com diabetes melito tipo 2, comumente, apresentam uma combinação de resistência à insulina e disfunção das células  $\beta$ , porém sem necessitar de insulina exógena para manter a vida, embora essa possa ser administrada para controlar a hiperglicemia em alguns pacientes. O diagnóstico baseia-se, mais comumente, na presença de hiperglicemia, isto é, glicose sanguínea acima de 126 mg/dl (Champe 2006).

O quadro de resistência à insulina, característico do diabetes tipo 2, se deve a capacidade diminuída dos tecidos alvos como o fígado, tecido adiposo e músculo, de responderem adequadamente as concentrações normais circulantes de insulina gerando uma produção descontrolada de glicose hepática acompanhada por uma captação diminuída da glicose sanguínea por esses tecidos. A obesidade é a causa mais comum desse tipo de resistência (Champe 2006).

#### **2.1.4 Dislipidemia**

A dislipidemia, uma das principais alterações encontradas na síndrome metabólica, é caracterizada pelo aumento dos ácidos graxos livres circulantes e pela elevação dos triglicérides (conseqüente à reesterificação inadequada) que pode ser parcialmente determinada por falha dos adipócitos em reter os ácidos graxos livres em seu interior, aumentando assim seu fluxo para a circulação (Murakami and Yamada 1997; Havel 2004). Todas essas alterações aumentam a

liberação de ácidos graxos livres para o fígado, sendo todo o mecanismo facilitado pelo quadro de resistência à insulina.

O aumento no suprimento de ácidos graxos para o fígado, proveniente das reservas de gordura, leva a maior produção hepática de triglicérides, que após serem sintetizados, são liberados e transportados pelas lipoproteínas (Lp) de muito baixa densidade (VLDL). O excesso de triglicérides é trocado pelo éster colesterol contido nas partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL) e, quando há elevada produção da VLDL, pode ocorrer seu acúmulo, devido à saturação do processo lipolítico (Aspichueta, Perez-Agote et al. 2006).

Para se explicar mais detalhadamente esse processo, temos como ponto de partida o transporte através de duas Lp ricas em triglicérides: os quilomícrons, que fazem o transporte de lípidos da dieta, e as VLDL, que fazem o transporte dos lípidos de origem endógena para os tecidos (Kane, Hardman et al. 1980). As VLDL são sintetizadas no retículo endoplasmático (Gibbons 1990) e moduladas por fatores hormonais, além de serem dependentes do balanço energético e metabólico. Sua meia-vida na circulação em humanos é de 1-3 horas (Kovanen, Bilheimer et al. 1981) e tem como principal função o transporte de triglicérides e colesterol para os tecidos periféricos. Este sistema de transporte envolve duas classes de lípidos hidrofóbicos, os triglicérides e o colesterol éster (CE), que são hidrolizados em ácidos graxos e colesterol livre, respectivamente, antes de serem utilizados pelas células (Brown, Kovanen et al. 1981).

As LDL são derivadas da VLDL plasmática na sua maior parte, mas uma pequena porção pode ser proveniente da secreção direta do fígado ou do intestino, com seus níveis circulantes determinados primariamente pela taxa de

remoção do plasma e não pela sua taxa de produção (Brown, Kovanen et al. 1981; Brown and Goldstein 1986). A LDL é constituída por cerca de 46% a 50% de colesterol éster, 4% a 8% de triglicérides, 18% a 24% de fosfolípidos, 6% a 8% de colesterol e 18% a 22% de proteínas. Sua meia-vida é de dois a três dias (Lee and Alaupovic 1970) e tem densidade entre 1,020 a 1,063 g/mL. Sua função fisiológica é transportar o colesterol necessário para a síntese de membranas das células em divisão e para a síntese de hormônios esteróides no córtex da supra-renal e gônadas, constituindo cerca de 70% do colesterol plasmático total em indivíduos normais (Soutar, Myant et al. 1977).

O HDL forma uma classe de lipoproteínas de alta densidade que variam em tamanho e capacidade, e carregam o colesterol dos tecidos para o fígado. Ele possui a capacidade de remover o colesterol livre circulante (que poderia vir a formar ateroma) e transportá-lo de volta ao fígado para que ocorra o seu metabolismo gerando parte dos sais biliares, sendo assim chamado popularmente de "bom colesterol" (Dedonder-Decoopman, Fievet-Desreumaux et al. 1980).

O desbalanço no equilíbrio LDL/HDL associado ao aumento dos níveis circulantes de triglicérides livres caracteriza o quadro de dislipidemia. Cada vez mais as pesquisas apontam a importância do aumento das concentrações circulantes de HDL para o controle desse quadro (Dedonder-Decoopman, Fievet-Desreumaux et al. 1980).

## **2.2 Adipocinas**

Como órgão endócrino, o tecido adiposo apresenta várias particularidades. Ele se encontra disperso pelo organismo, em depósitos sem

ligação física entre si e possui atividade secretória regulada por mecanismos neurais e humorais, não totalmente esclarecidos (Guerre-Millo 2004; Rodriguez, Catalan et al. 2007). Nesses depósitos individuais, encontram-se vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos) com atividade secretória variável. As adipocinas são também produzidas em menor quantidade por outros tecidos, sendo difícil determinar a contribuição do tecido adiposo para os níveis de todas as adipocinas circulantes (Guerre-Millo 2004).

As adipocinas desempenham um papel importante na homeostasia energética, sensibilidade à insulina, resposta imunológica e doença vascular podendo assim ser agrupadas de acordo com a principal função. Algumas das principais adipocinas com função metabólica e endócrina são as seguintes (Guerre-Millo 2004):

### **2.2.1 Leptina**

A leptina é o produto do gene da obesidade (*ob*) que é expresso, predominantemente, nos adipócitos (Halaas, Gajiwala et al. 1995). Estudos em roedores sugeriram que a leptina age como um fator de sinalização do tecido adiposo para o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético e, assim, fazendo a homeostase do peso corporal e mantendo constante a quantidade de gordura (Caro, Sinha et al. 1996). A descoberta da leptina tem ajudado a esclarecer o papel dos adipócitos como sistema endócrino e de que modo ocorre a sinalização para a ingestão ou não de alimentos, bem como a regulação do metabolismo energético. Assim, a coordenação do balanço energético e do peso corporal envolve uma regulação entre a ingestão de alimentos e gasto de energia em resposta a sinais agudos (insulina e



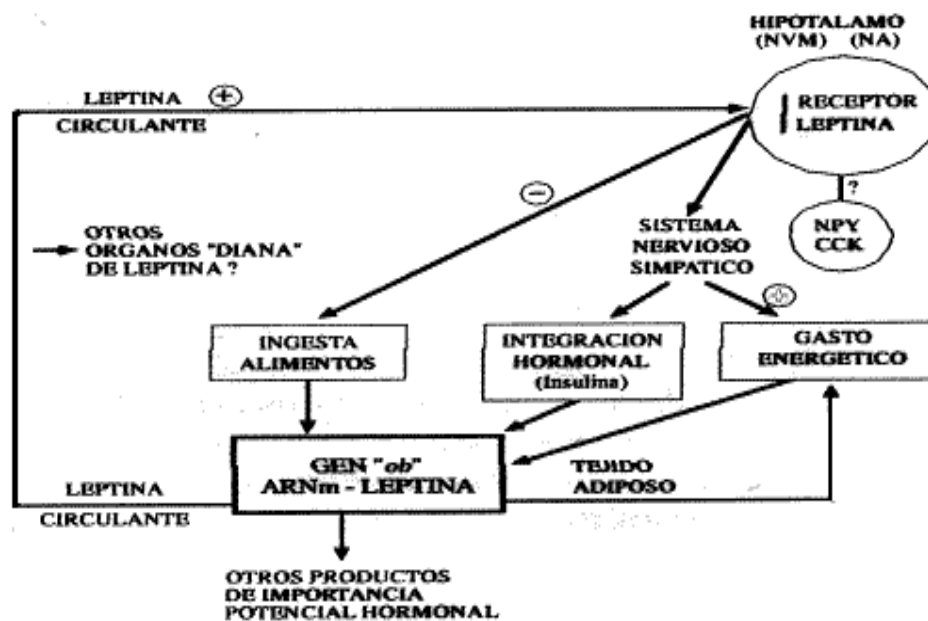
catecolaminas como a adrenalina) e crônicos (gravidez, desnutrição, inflamações, caquexia e leptina). Os níveis de leptina circulantes parecem estar diretamente relacionados com a quantidade de RNAm para leptina no tecido adiposo. Além disso, vários fatores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a transcrição dos genes da leptina em adipócitos. Por exemplo, ocorre diminuição de leptina em resposta a baixos níveis de insulina, havendo uma relação diretamente proporcional entre as concentrações desses hormônios (Considine and Caro 1996).

A propriedade inibidora do apetite da leptina deve-se ao mecanismo de sinalização deste hormônio no hipotálamo, estimulando a síntese de neuropeptídeos anorexigênicos como POMC (Proopiomelanocortina),  $\alpha$ -MSH (Hormônio Estimulante de  $\alpha$ -Melanócitos), CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina) e CART (Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina) que diminuem a ingestão de alimentos pela sensação de saciedade. Os neuropeptídeos anorexigênicos, por sua vez, inibem a síntese de neuropeptídeo Y (NPY), que estimula a ingestão de alimentos, inibe a termogênese e é diminuído por altos níveis séricos de insulina, promovendo aumento da lipogênese, síntese protéica e armazenamento de glicose (Tritos and Mantzoros 1997).

A leptina, ao estimular a liberação de norepinefrina, induz os adipócitos a ativar a via de sinalização do AMPcíclico e proteína quinase A (PKA), estimulando a transcrição do gene para proteínas desacopladoras da fosforilação oxidativa (Considine and Caro 1996).

Demonstrou-se em roedores que a hiperleptinemia reduz a síntese de triglicérides e aumenta a oxidação dos ácidos graxos em ilhotas pancreáticas

normais (Shimabukuro, Koyama et al. 1997) levando a uma disfunção das células beta, privando-as do sinal lipídico necessário para a resposta insulínica a outros substratos (Koyama, Chen et al. 1997). Este achado e a observação de que a insulina estimula a secreção de leptina sugeriu a possível existência de uma regulação retrógrada negativa entre a insulina e a leptina.



**Figura 1-** Esquema representativo do mecanismo hipotético de regulação da leptina. (Sánchez 1997).

Considine e Caro em 1996 desenvolveram trabalhos investigando a hipótese de que a obesidade possa resultar de uma diminuição da sensibilidade do organismo aos efeitos da leptina. Estudos genéticos mostraram que sujeitos obesos não apresentam modificações genéticas frente a sujeitos magros e que esses não têm déficit de leptina, e que, ao contrário, seus níveis plasmáticos são elevados em proporção direta ao tecido adiposo e ao balanço energético. Isso sugere que os adipócitos funcionam normalmente, e a obesidade se associaria a um mecanismo de resistência endógena à leptina.

### 2.2.2 Resistina

Embora se reconhecesse há algum tempo que o diabetes tipo 2 está associado ao excesso de tecido adiposo e à resistência à insulina, tanto em humanos como em modelos experimentais da doença, a causa última desta relação permanecia mal definida. Considerava-se que os ácidos graxos livres provenientes dos adipócitos, por inibirem a captação de glicose pelo músculo esquelético, eram a causa mais importante de resistência à insulina. Mais tarde, proteínas e peptídeos também secretados pelo tecido adiposo passaram a ser apontados como agentes decisivos da insensibilidade à insulina em vários tecidos (Spiegelman and Flier 1996). Porém, para os pesquisadores dessa área, era claro que outro elo ou elos adicionais poderiam existir para justificar, ao nível celular, a relação tão estreita entre resistência à insulina e obesidade.

Em 2000, um grupo de pesquisadores liderados por Claire Steppan (Steppan, Bailey et al. 2001) da Universidade da Pensilvânia identificou no tecido adiposo um mediador que denominaram resistina (de resistência à insulina). Essa proteína, ao que tudo indica, se torna uma possibilidade mais consistente de explicação dos eventos que levam à resistência à insulina. Trabalhando com uma das tiazolidinedionas, a rosiglitazona, em várias linhas celulares de adipócitos, caracterizaram um novo mRNA expresso pelo tecido adiposo e que era suprimido por este fármaco. Assim demonstraram que a proteína codificada por este mRNA se expressava em grandes quantidades em vários roedores obesos, e que as tiazolidinedionas reduziam sua secreção tanto *in vitro* como na corrente sanguínea de camundongos (Steppan, Bailey et al. 2001). Levantaram a hipótese que as tiazolidinedionas, pela sua ação sobre receptores nucleares gama ativados por proliferadores de peroxissomas, os PPAR- $\gamma$ , modulariam a

expressão de um gene específico do adipócito, a resistina, que estaria envolvido nas vias de sinalização moduladas pela insulina. Os PPAR- $\gamma$  pertencem a uma família de fatores de transcrição induzidos durante a diferenciação dos adipócitos e que atuam na sensibilidade dessas células à insulina (Braissant, Fougère et al. 1996). Contudo, numerosas dúvidas ainda existem sobre a resistina. Não se sabe, por exemplo, qual seria a ação da resistina em outros alvos fisiológicos da insulina além dos adipócitos, como o fígado, músculo e cérebro; nem quais seriam as características de seu receptor e o papel da resistina na fisiologia normal. Entende-se menos ainda os mecanismos exatos de sinalização resistino-mediada (Yoshimoto, Naruse et al. 1999). Além disso, não foram observadas as mesmas respostas encontradas em roedores quando se analisou a espécie humana.

### **2.2.3 Adiponectina**

A adiponectina (ApN) é uma adipocina secretada especificamente pelos adipócitos e circula em concentrações relativamente altas na corrente sanguínea. Ela desenvolve um papel fundamental na homeostase energética e na inflamação (Lyon, Law et al. 2003). Essa proteína de 30-KDa é composta por uma porção N-terminal domínio colágeno e uma porção C-terminal domínio globular. O fragmento gerado (gApN) pela proteólise da ApN possui várias ações biológicas (Fruebis, Tsao et al. 2001). Dois tipos de receptores de adiponectina já foram caracterizados e medeiam suas ações, principalmente, via estimulação de AMPK, PPAR- $\alpha$ , e p38 MAPK. O AdipoR1 possui alta afinidade por gApN e é abundantemente expresso em músculos esqueléticos. Já o AdipoR2, que possui afinidade moderada por ambas as formas de ApN, é predominantemente expresso no

fígado (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Ambos receptores estão presentes nos adipócitos, sugerindo que a ApN possa agir nessas células, possuindo assim ações tanto autócrinas quanto parácrinas.

Ao contrário das demais adipocinas, a ApN circulante está diminuída em indivíduos obesos e em desordens relacionadas, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, e outros componentes do quadro de síndrome metabólica (Guerre-Millo 2004). Foi demonstrado que o tratamento com ApN em camundongos deficientes em apolipoproteína-E exerce efeito protetor contra a formação de placas ateroscleróticas (Okamoto, Kihara et al. 2002). O mecanismo implicado nesses efeitos benéficos se explica, em parte, pelo fato da ApN alterar o metabolismo lipídico gerando aumento da oxidação de ácidos graxos em vários tecidos, incluindo fígado e músculo, acelerando o “*clearance*” plasmático dos mesmos (Yamauchi, Kamon et al. 2002). Além disso, foi demonstrado que a ApN aumenta a termogênese em vários órgãos.

Clinicamente foi documentada uma forte associação inversa entre níveis séricos de adiponectina e o risco de doença arterial coronariana. A associação mostrou uma clara relação dose-resposta que persistiu mesmo após ajuste para fatores de risco convencionais, incluindo diabetes e índice de massa corpórea (IMC). A mais forte correlação ocorreu entre as concentrações plasmáticas de colesterol HDL, e apolipoproteína A1, sabidamente essencial na formação da partícula de HDL (Altinova, Toruner et al. 2007). A função anti-aterogênica mais importante desta partícula é a participação no transporte reverso do colesterol, da circulação para o fígado onde é disponibilizado sob a forma de sais biliares.

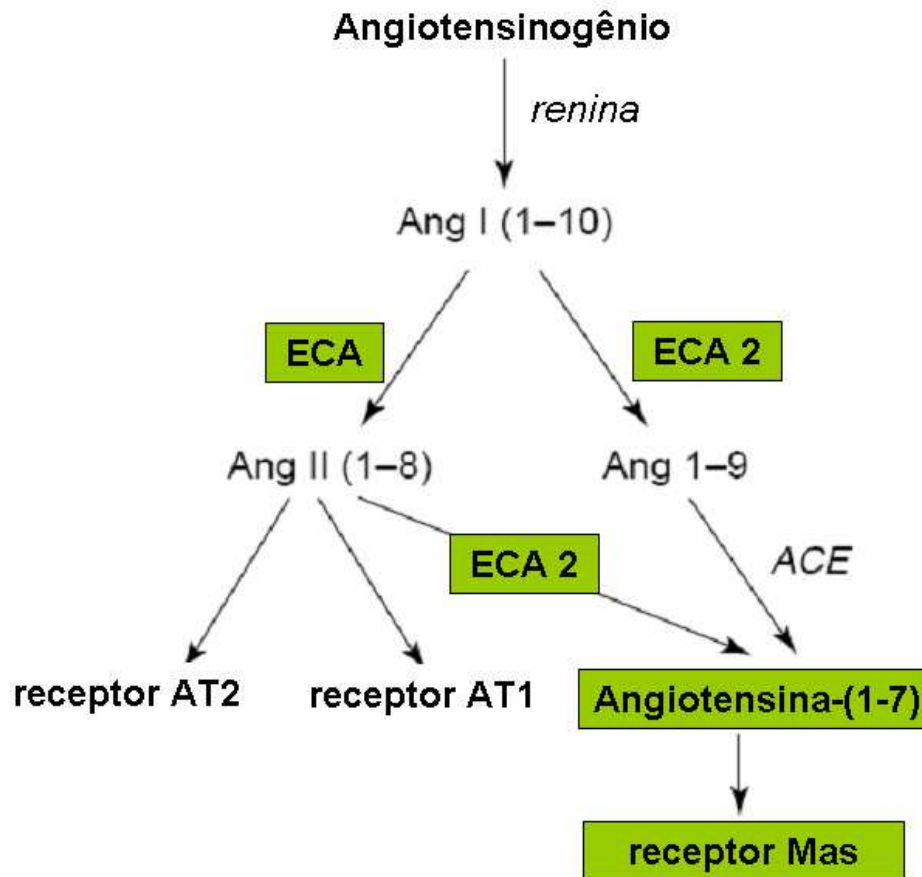
Também observou-se uma correlação inversa do ApN com o TNF- $\alpha$ , (pró-inflamatório), cuja expressão é proporcional ao grau de resistência à insulina que pode ser um fator inibidor da atividade promotora do gene da adiponectina e pode explicar, em parte, a associação inversa observada entre o acúmulo de gordura visceral, a secreção elevada de TNF- $\alpha$  e os níveis diminuídos de adiponectina (Rothenbacher, Brenner et al. 2005)).

### **2.3 Sistema Renina-Angiotensina**

O sistema renina-angiotensina se constitui uma coordenada cascata hormonal circulante iniciada pela liberação da enzima renina, sintetizada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é liberada por exocitose agindo enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT), produzido pelo fígado, hidrolisando-o em um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I). Este peptídeo é catabolizado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo com relevantes ações biológicas, a Ang II, que age através de seus receptores específicos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. A Ang II também pode ser formada por outras vias independentes da renina, pela ação de catepsinas e quimases. Outro importante componente desse sistema é o heptapeptídeo Ang-(1-7) que, agindo via receptor Mas, promove geralmente ações antagônicas às geradas pela Ang II. Ele pode ser produzido a partir da Ang II ou da Ang I através da ação da ECA 2, PEP e NEP (Santos and Ferreira 2007).

Nas duas últimas décadas tem-se mostrado a existência de SRAs teciduais com expressão de todos os componentes independentemente do

sistema circulante, dentre esses tecidos um exemplo claro é o tecido adiposo (Ribeiro-Oliveira, Nogueira et al. 2008).



**Figura 2-** Visão atual dos principais componentes do sistema renina-angiotensina

### 2.3.1 Angiotensina II (Ang II)

A Ang II é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos e é considerada o principal componente biologicamente ativo do SRA.

Acreditava-se que a Ang II era metabolizada em fragmentos de peptídeos biologicamente inativos por peptidases da circulação e dos tecidos. No entanto, vários estudos mostraram que pelo menos três desses produtos metabólicos

apresentam atividade biológica. A Ang II pode ser degradada à des-aspartil<sup>1</sup>-Ang II (Ang III) que é eqüipotente à Ang II em sua interação com o receptor AT<sub>1</sub>, mas tem baixa eficácia *in vivo* devido ao seu metabolismo acelerado na circulação. O segundo produto metabólico da Ang II é o hexapeptídeo Ang IV que pode gerar vasodilatação e natriurese (Hainault, Nebout et al. 2002).

A Ang II exerce seus efeitos via dois receptores distintos, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Batenburg, Garrelds et al. 2004), sendo que os mais conhecidos efeitos fisiológicos e patológicos da Ang II são mediados via receptores AT<sub>1</sub>, pela associação de múltiplas interações com cascatas de transdução de sinal que comandam diversas ações biológicas (Cheng, Vapaatalo et al. 2005).

Dentre as principais ações via AT<sub>1</sub>, a Ang II induz vasoconstrição vascular (preferencialmente renal, cerebral e coronariana); a retenção renal de sódio (via liberação de aldosterona); retenção renal de água (via liberação de vasopressina); supressão da renina (por “feedback” negativo); hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos; estimulação de fibrose no miocárdio e vascular; efeito inotrópico positivo (contração de cardiomiócitos); ativação do sistema nervoso simpático (SNS); estimulação da secreção endotelial e estimulação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS) (Cheng, Vapaatalo et al. 2005).

O receptor AT<sub>2</sub>, na maioria das vezes, exerce efeitos opostos às ações mediadas pelo receptor AT<sub>1</sub>. Sua expressão é muito alta no período fetal e decai com o envelhecimento. Os principais efeitos de sua ativação são o antiproliferativo, a inibição do crescimento celular; diferenciação celular; reparação tecidual; apoptose; vasodilatação; desenvolvimento dos rins e trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca (Batenburg, Garrelds et al. 2004).



Sabe-se que doenças como hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e aterosclerose estão correlacionadas com a disfunção vascular e mudanças estruturais, incluindo disfunção endotelial, alteração da contratilidade e remodelamento vascular; alterações que podem ser geradas por aumento da atividade da Ang II nos vasos (Giacchetti, Sechi et al. 2005). Os eventos celulares relacionados com esse processo envolvem mudanças no músculo vascular liso com relação ao crescimento, apoptose, migração celular, inflamação e fibrose. Dentre os vários fatores que influenciam as mudanças celulares, a Ang II aparece como um dos mais importantes (Cheng, Vapaatalo et al. 2005). Evidências crescentes indicam que a Ang II induz efeitos pleitrópicos vasculares através da formação de NADPH, gerando ERO, que são importantes segundos mensageiros intracelulares e intercelulares, modulando vários sinais moleculares, como as proteínas tirosina fosfatases, proteínas tirosina quinases, fatores de transcrição, ativação de canais iônicos, dentre outros. Sob condições patológicas as ERO contribuem para a disfunção vascular e remodelamento através de danos oxidativos (Singh and Mehta 2003).

### **2.3.2 Angiotensina-(1-7)**

A Ang-(1-7) é um importante metabólito da Ang II, uma vez que estudos recentes já apontam seu possível papel terapêutico (Santos, Ferreira et al. 2005). Sabe-se que a Ang-(1-7) libera óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>) causando vasodilatação, inibindo a proliferação celular muscular e a trombogênese, (Kucharewicz, Pawlak et al. 2002; Rajendran, Chirkov et al. 2005), atenuando o efeito vasoconstritor da Ang II (Lemos, Cortes et al. 2002);(Clark, Diz et al. 2001) e inibindo a ECA (Deddish, Marcic et al. 1998).

Desequilíbrios na interação harmônica entre Ang II e Ang-(1-7) parecem contribuir para o início e desenvolvimento de doenças como a hipertensão.

A formação de Ang-(1-7) é controlada por pelo menos três enzimas que estão presentes na circulação sangüínea e em alguns tecidos (Welches, Santos et al. 1991; Yamamoto, Chappell et al. 1992), podendo assim ser sintetizada a partir da Ang I pela ação das endopeptidases teciduais denominadas prolil-endopeptidase (PEP) e endopeptidase neutra (NEP) (Ferrario, Chappell et al. 1997) ou sendo formada a partir da Ang II pela ação da prolil-endopeptidase e da prolil-carboxipeptidase (PCP). Recentemente, foi descrita uma nova via de formação da Ang-(1-7) por ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) (Donoghue, Hsieh et al. 2000; Crackower, Sarao et al. 2002). A ECA 2 é responsável pela conversão da Ang I em angiotensina-(1-9), que pode ser posteriormente convertida em Ang-(1-7) por ação da ECA ou de outras peptidases (Donoghue, Hsieh et al. 2000). Além disso, a ECA 2 promove a conversão direta da Ang II em Ang-(1-7) com afinidade superior à que hidrolisa a Ang I.

A Ang-(1-7) pode ser hidrolizada pela ECA formando a angiotensina-(1-5) e a angiotensina-(1-3). Esta parece ser uma importante via de inativação da Ang-(1-7) circulante e, possivelmente, também da forma tecidual desse peptídeo (Yamada, Iyer et al. 1998).

As concentrações plasmáticas da Ang-(1-7) são normalmente menores que as da Ang II, tendo, em ratos, um valor aproximado de 10 a 40 fmoL/mL (Santos, Simoes e Silva et al. 1996). O tempo de meia vida plasmática da Ang-(1-7) também é menor que o da Ang II, sendo de aproximadamente 10 segundos, um quinto da observada para a Ang II (Yamada, Iyer et al. 1998).

Atualmente, sabe-se que a Ang-(1-7) apresenta ações tanto centrais quanto periféricas e que estas podem ser similares, opostas ou diferentes das induzidas pela Ang II (Ferrario, Barnes et al. 1990; Santos, Campagnole-Santos et al. 2000). Vários trabalhos mostram que a Ang-(1-7) participa do controle do balanço hidroeletrolítico (Santos, Simoes e Silva et al. 1996), promove inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares (Freeman, Chisolm et al. 1996), inibe o crescimento de miócitos cardíacos (Tallant, Ferrario et al. 2005), apresenta efeito antitrombótico (Kucharewicz, Chabielska et al. 2000) e antiarrítmico (Ferreira, Santos et al. 2001) dentre outros. A produção renal de Ang-(1-7) possui um importante papel na regulação da pressão arterial. Em ratos, a Ang-(1-7) apresenta ação natriurética, tanto em rins isolados, como em animais anestesiados (Handa, Handa et al. 2001), sugerindo que esse peptídeo exerce um efeito vasodilatador na microcirculação renal, com efeito anti-hipertensivo.

Quando microinjetada centralmente, a Ang-(1-7) pode apresentar efeitos antagônicos dependendo da área e da quantidade do peptídeo que está sendo infundido. Por exemplo, a microinfusão de Ang-(1-7) na região do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) produz aumento da pressão arterial e taquicardia. Porém, quando microinjetada na região do bulbo ventrolateral caudal (CVLM), a Ang-(1-7) provoca queda da pressão arterial e da frequência cardíaca (Silva, Fontes et al. 1993).

Além dos efeitos já discutidos, a Ang-(1-7) também desempenha um importante papel no controle da pressão arterial agindo como um hormônio vasodilatador em inúmeros leitos vasculares (Brosnihan, Li et al. 1998; Gorelik, Carbini et al. 1998; Machado, Ferreira et al. 2002), embora, menos

freqüentemente, também produza vasoconstrição (Osei, Ahima et al. 1993). De fato, várias evidências reforçam a hipótese de que as principais ações do SRA na regulação da pressão arterial sejam dependentes de um balanço entre os efeitos da Ang II e os da Ang-(1-7) (Ferrario, Chappell et al. 1997), sugerindo um importante papel para a Ang-(1-7) no controle dos níveis pressóricos.

Recentemente foi descrito que a infusão de Ang-(1-7) promove um potente efeito vasodilatador em ratos anestesiados atuando sobre diferentes leitos vasculares (Sampaio, Nascimento et al. 2003). Na maioria dos vasos estudados, o efeito vasorelaxante da Ang-(1-7) é completamente inibido pelo bloqueio da formação de NO. Da mesma forma, na ausência de endotélio funcional o efeito vasorelaxante da Ang-(1-7) também é abolido (Porsti, Bara et al. 1994; Machado, Ferreira et al. 2002; Ren, Garvin et al. 2002). Esses resultados sugerem que a Ang-(1-7) induz dilatação através da produção de NO endotelial. Acredita-se que o efeito vasodilatador desse heptapeptídeo possa ocorrer através da potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina (Porsti, Bara et al. 1994; le Tran and Forster 1997), além da estimulação do seu receptor específico (Fontes, Silva et al. 1994; Santos, Simoes e Silva et al. 2003), dependendo do leito vascular e da espécie animal estudada.

Vários trabalhos demonstram uma possível interação entre a bradicinina e a Ang-(1-7) ao nível vascular (Paula, Lima et al. 1995; Santos, Campagnole-Santos et al. 2000). A administração de Ang-(1-7), antes da infusão de bradicinina, potencializa o efeito vasodilatador induzido por esse último peptídeo. Esse efeito já foi descrito *in vivo* em animais normotensos (Paula, Lima et al. 1995) e hipertensos (Fernandes, Fortes et al. 2001) e *in vitro* em artérias coronárias de cães (le Tran and Forster 1997), dentre outros. Além disso,

também já foi demonstrado que, em alguns leitos vasculares, o efeito vasodilatador induzido pela Ang-(1-7) pode ser inibido pelo HOE 140, um antagonista específico do receptor B<sub>2</sub> da bradicinina (Porsti, Bara et al. 1994; Brosnihan, Li et al. 1996). Os mecanismos implicados nesses efeitos ainda não foram completamente elucidados. Uma das vias sugeridas na literatura para explicar a interação entre esses dois peptídeos é através da modulação local da atividade da ECA pela Ang-(1-7) (Jaspard, Wei et al. 1993; Roks, van Geel et al. 1999; Tom, de Vries et al. 2001). Sugere-se que a Ang-(1-7), inibindo a atividade da ECA, possa promover aumento nos níveis de bradicinina e esse pode ser um dos mecanismos através dos quais a Ang-(1-7) e a bradicinina se interrelacionam. Outros trabalhos sugerem ainda que a Ang-(1-7) poderia gerar potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina através da ressensibilização dos receptores B<sub>2</sub> (Tom, de Vries et al. 2001).

Atualmente, sabe-se que boa parte das ações da Ang-(1-7) ocorrem por estímulo do seu receptor específico, o Mas. A primeira evidência da existência de um receptor específico para a Ang-(1-7) foi obtida por Campagnole-Santos e colaboradores em 1992 (Campagnole-Santos, Heringer et al. 1992), que observaram a capacidade da Ang-(1-7) de induzir, contrariamente à Ang II, um aumento significativo na sensibilidade do controle barorreflexo. Vários outros estudos sugeriram a existência de um receptor seletivo para mediar as ações da Ang-(1-7) (Santos, Campagnole-Santos et al. 2000). Tallant e colaboradores em 1997 (Tallant, Lu et al. 1997) mostraram em cultura de células endoteliais de aorta bovina sítios específicos de ligação para a Ang-(1-7).

No entanto foi apenas em 2003 que estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o receptor órfão acoplado à proteína G, codificado

pelo protooncogene *Mas*, é um ligante funcional para a Ang-(1-7) (Santos, Simoes e Silva et al. 2003). Na ausência desse receptor, vários efeitos da Ang-(1-7) são abolidos. Além disso, também foi mostrado que em cultura de células CHO (ovário de hamster chinês), transfectadas com *Mas*, a Ang-(1-7) apresenta alta afinidade de ligação. Essa ligação da Ang-(1-7) ao receptor *Mas* pode ser deslocada pelo antagonista específico, o A-779, mas não pelos antagonistas dos receptores AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> da Ang II, CV11974 e PD123319, sugerindo que o A-779 é um antagonista específico para o receptor *Mas* (Santos, Simoes e Silva et al. 2003).

### **2.3.3 Camundongo *Knockout Mas***

O protooncogene *Mas* foi primeiramente detectado em células tumorais sendo responsável pela codificação de proteínas indispensáveis para o crescimento tumoral (Young, Waitches et al. 1986).

Atualmente, sabe-se que o *Mas* codifica um receptor com estrutura similar a dos membros da família dos receptores que apresentam sete domínios transmembrana. De fato, o *Mas* codifica um receptor acoplado a proteína G que, até então, era considerado um receptor órfão; suspeitava-se apenas que ele estaria envolvido com as ações das angiotensinas (Von Bohlen und Halbach, Walther et al. 2000).

A Ang II foi considerada como um possível ligante para o receptor *Mas*, porém, Ambroz e colaboradores (Ambroz, Clark et al. 1991) mostraram que o aumento de cálcio intracelular induzido pela Ang II em células transfectadas com *Mas* era dependente da expressão do receptor AT<sub>1</sub> da Ang II, descartando dessa

forma essa possibilidade. Outros experimentos demonstraram que o receptor *Mas* modula a sinalização intracelular induzida pela estimulação dos receptores  $AT_1$  (Von Bohlen und Halbach, Walther et al. 2000), mantendo, assim, a hipótese de que o *Mas* e as angiotensinas se interrelacionam.

Recentemente, foram desenvolvidos camundongos com deleção para o protooncogene *Mas* (KO-*Mas*), a partir do camundongo C57Bl/6 e do camundongo da linhagem FVB/N (Walther, Balschun et al. 1998), o que permitiu estudar a importância fisiológica da proteína codificada por esse gene. Nos camundongos *knockout* a expressão do mRNA para o *Mas* não está presente nos principais órgãos onde esse gene é encontrado em camundongos adultos como: coração, rins, testículos e cérebro (Alenina, Bader et al. 2002).

Apesar desse gene ser altamente expresso nos testículos, principalmente em animais adultos, a deleção do protooncogene *Mas* não produziu alterações de fertilidade ou de reprodução nos camundongos (Walther, Balschun et al. 1998; Walther, Voigt et al. 2000). Possíveis alterações comportamentais podem ocorrer devido a alterações nos hormônios gonodais, uma vez que o *Mas* é expresso em grande quantidade nos testículos (Walther, Wessel et al. 2000).

Devido a sua possível relação com o SRA Walther e colaboradores (1998) (Walther, Balschun et al. 1998) avaliaram a existência de alterações nos parâmetros cardiovasculares. A princípio não foram encontradas diferenças significativas na pressão arterial ou na frequência cardíaca dos animais KO-*Mas* com background C57Bl/6 (Walther, Balschun et al. 1998). Porém, novas análises verificaram uma diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e um aumento do tônus simpático nos camundongos *knockout* em relação aos

controles, sendo essa diferença maior entre as fêmeas (Walther, Wessel et al. 2000). Nos animais KO-Mas com background FVB/N foi observado, por Moura e colaboradores, que ocorre aumento significativo da pressão arterial e disfunção endotelial associada à microalbuminúria (dados não publicados).

Em camundongos C57Bl/6 *Knockout* para o Mas a ligação e a sinalização intracelular da Ang II nos rins não estão alteradas em relação aos camundongos controle (Walther, Balschun et al. 1998), indicando que o Mas não interfere na ligação da Ang II nos seus receptores específicos. Ao contrário do resultado obtido com a Ang II, a ligação da Ang-(1-7) em fragmentos de rins é abolida nos camundongos *knockout* demonstrando que o Mas é importante para a ligação desse heptapeptídeo (Santos, Simoes e Silva et al. 2003).

Experimentos realizados utilizando camundongos deficientes para o receptor Mas mostram que na ausência desse receptor vários efeitos da Ang-(1-7) são abolidos, como, por exemplo, o efeito antidiurético desse peptídeo em camundongos com sobrecarga hídrica (Santos, Simoes e Silva et al. 2003).

Apesar de bem definida a existência desse receptor para a Ang-(1-7), nem todos os efeitos fisiológicos desse heptapeptídeo podem ser explicados por sua interação com o Mas. Alguns efeitos da Ang-(1-7) não são completamente inibidos na presença do A-779 (Bayorh, Eatman et al. 2002), nem mesmo na presença dos antagonistas dos receptores da Ang II, o que sugere fortemente a existência de outros mecanismos de ação ou outros receptores para esse peptídeo.

Embora os mediadores implicados no efeito relaxante da Ang-(1-7) estejam parcialmente descritos os receptores implicados nesse efeito ainda não foram completamente elucidados. Além disso, o papel desse receptor no metabolismo



nunca foi estudado; deixando perspectivas sobre o papel da Ang-(1-7) e do receptor Mas no controle metabólico do organismo.

#### **2.3.4 Interação do sistema renina-angiotensina com o metabolismo**

Cassis e colaboradores (Cassis 1993) sugeriram que a Ang II teria um papel potencial significativo na termogênese induzida pelo frio. Além disso, ratos obesos fa/fa apresentam atividade reduzida da renina plasmática e menor densidade dos receptores AT<sub>1</sub> no tecido adiposo, que se associam a modesta resposta do peptídeo quanto à liberação de norepinefrina, quando comparados aos animais controle (Cassis, Fettinger et al. 1996).

Vários componentes do SRA foram descritos no tecido adiposo (Massiera, Seydoux et al. 2001). Estudos realizados nos últimos anos mostraram que o SRA modula de forma importante o metabolismo e a função endócrina nesse tecido. No quadro de síndrome metabólica já foram descritos aumento da atividade da renina plasmática, maior nível plasmático de angiotensinogênio, maior atividade da ECA, e maior nível plasmático de aldosterona (Engeli, Negrel et al. 2000). Os níveis de mRNA de AGT são 60% maiores no tecido adiposo do que no fígado, que é considerado principal fonte de AGT (Harp and DiGirolamo 1995). Além disso, a expressão de AGT é mais elevada em adipócitos viscerais do que em adipócitos subcutâneos tanto em ratos como em humanos (Safonova, Aubert et al. 1997). Os adipócitos de ratos e de humanos apresentam os dois subtipos de receptores angiotensinérgicos, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, embora ainda não estejam claras as funções específicas desencadeadas por esses receptores nessas células. *In vivo*, a expressão do gene para o receptor AT<sub>1</sub> no tecido adiposo

parece ser dependente da idade, uma vez que foi observada uma menor densidade de receptores AT<sub>1</sub> nos ratos SD idosos e obesos quando comparados com ratos jovens e magros. Os sítios de afinidade entre o receptor AT<sub>1</sub> e a angiotensina II têm cinética semelhante aos de outros órgãos alvo do peptídeo sendo a densidade desse receptor no tecido adiposo semelhante à do coração (Cassis, Laughter et al. 1998). Estudos utilizando cultura de células adiposas mostraram que o AGT e a Ang II participam da regulação e diferenciação do fenótipo do adipócito. É provável que o aumento no conteúdo de triglicerídeos e da atividade de duas enzimas, a sintetase de ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, sejam mediadas pela Ang II, mostrando que esse peptídeo controla a adiposidade pela regulação da síntese e armazenamento de lipídios (Safonova, Aubert et al. 1997).

É interessante observar que em cultura de células adiposas, a Ang II é um fator adipogênico, enquanto no animal vivo, atua como importante redutor do peso e da massa adiposa. Sabe-se que existe uma correlação significativa entre a pressão arterial, o índice de massa corporal, e os níveis do AGT plasmático em indivíduos normotensos e magros (Engeli, Negrel et al. 2000). Aproximadamente 20% da variação do AGT plasmático é determinada pelos níveis plasmáticos da leptina, que serve como um indicador da massa de tecido adiposo, (Prasad and Quyyumi 2004) sugerindo que esse tecido contribua para os níveis de AGT plasmático.

Estudos experimentais sugerem que o SRA do tecido adiposo, regulado por fatores hormonais e nutricionais, é influenciado pelo grau de obesidade, pelo fato de que a Ang II pode modular o fluxo sanguíneo, por fatores de crescimento e pelo metabolismo local. Assim, a ativação do SRA pode determinar efeitos

deletérios locais e sistêmicos em obesos e pode contribuir assim para o surgimento da HAS e outras doenças. A resistência à insulina por sua vez, está associada com o aumento da liberação de ácidos graxos livres que são convertidos no fígado em triglicerídeos e secretados em partículas lipoprotéicas de muita baixa densidade (VLDL).

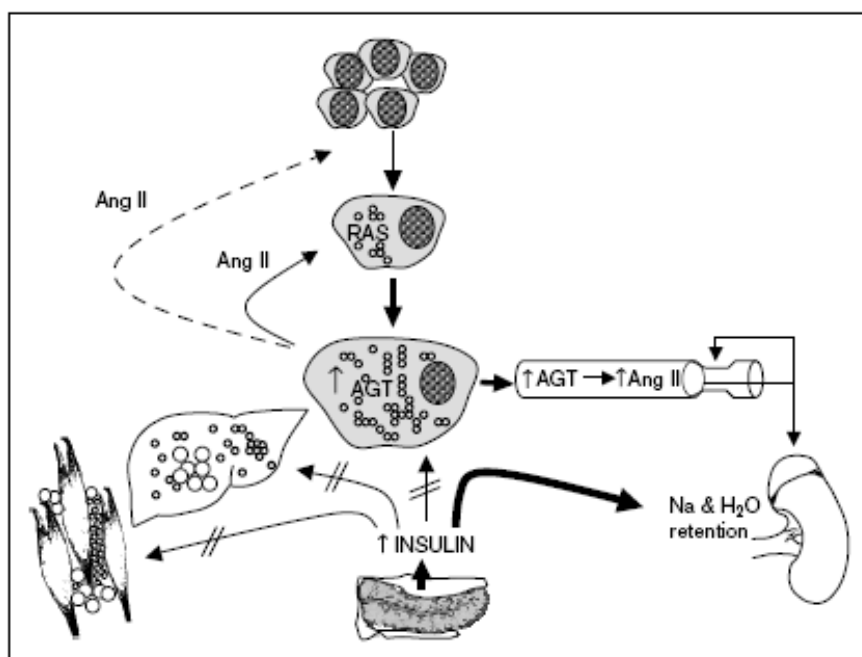
A resistência à insulina induz uma redução da biodisponibilidade do NO em modelos experimentais e em indivíduos saudáveis (Singh and Mehta 2003). Indivíduos insulino-resistentes apresentam resposta vasodilatadora endotélio-dependente prejudicada e a disfunção endotelial pode ser também detectada em indivíduos saudáveis com primeiro grau de parentesco com os indivíduos diabéticos do tipo 2 (Shinozaki, Ayajiki et al. 2004). Portanto, a disfunção endotelial é um elo comum entre a HAS, diabetes melito e a síndrome metabólica.

A Ang II está altamente correlacionada com a disfunção endotelial presente nos indivíduos hipertensos, diabéticos, obesos e com a síndrome metabólica. Esse peptídeo está implicado com o crescimento celular e com o processo inflamatório. Desta forma, o estresse oxidativo provocado pela a Ang II pode resultar em aumento da produção de endotelina (ET-1), das moléculas de adesão como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1), fator nuclear-k B (NF-kB), interleucina 6 (IL-6) dentre outros mediadores inflamatórios (Cooper, Stokes et al. 2002).

Além da contribuição do SRA, principalmente via Ang II, na gênese da síndrome metabólica já descrita acima, interações em diferentes níveis desse sistema com a insulina são implicadas como fator fundamental para o

desenvolvimento da DM tipo II e síndrome metabólica (Engeli, Schling et al. 2003).

Os estudos na literatura sugerem que a Ang II, via receptor  $AT_1$  pode modular as ações da insulina. Assim, a ativação do SRA induz o aparecimento de resistência às ações metabólicas da insulina, provocando hiperglicemia e elevação dos níveis de colesterol (VLDL), triglicérides, e potencializando o efeito proliferativo da insulina. Além disso, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia ativam o SRA através do aumento da expressão de AGT, Ang II e receptores  $AT_1$ , que podem assim induzir aparecimento do quadro de hipertensão arterial, disfunção cardiovascular e renal (Engeli, Schling et al. 2003). Dessa forma, substâncias produzidas pelo tecido adiposo podem interagir com o SRA reforçando suas ações, participando então das alterações cardiovasculares e renais associadas à obesidade e à síndrome metabólica (Blaj, Stanciu et al. 2003).



**Figura 3-** Alterações patofisiológicas associadas com a ativação do SRA do tecido adiposo na obesidade. Todos os componentes do SRA estão presentes

no tecido adiposo. A expressão de AGT está aumentada na obesidade, o que leva ao super-aumento da concentração de Ang II no tecido adiposo, que por sua vez induz a inibição da diferenciação do pré-adipócito e promove o acúmulo de triglicérides nos adipócitos maduros devido ao seu efeito antilipolítico. O aumento de adipócitos maduros repletos de triglicérides diminui a sensibilidade insulínica do tecido adiposo. Supõe-se que o desvio do fluxo de moléculas de triglicérides para o fígado e para o músculo esquelético (hipótese da lipotoxicidade), possa gerar resistência a insulina. A hiperinsulinemia favorece a ativação simpática e a retenção de sódio e água (resistência insulínica seletiva). Através da hiperinsulinemia ocorre aumento dos níveis plasmáticos de angiotensinogênio devido à hipersecreção do adipócito que ocorre na obesidade: isso pode ser o fator responsável pelo aumento da produção de Ang II com subsequente vasoconstrição, elevação da retenção de sódio e água, levando a um quadro de hipertensão. As linhas contínuas denotam ações estimulatórias e as linhas pontilhadas denotam ação inibitória. AGT, angiotensinogênio; Ang II, angiotensina II; RAS, sistema renina–angiotensina (Strazzullo and Galletti 2004).

### **2.3.5 Mecanismos moleculares que podem correlacionar o SRA à SM**

Vários estudos têm demonstrado a convergência de vias metabólicas relacionadas ao mecanismo intracelular de ação da insulina com o SRA, especialmente com a Ang II (Marrero, Fulton et al. 2004; Touyz 2005; Watanabe, Barker et al. 2005).

Assim como outros fatores de crescimento, a insulina estimula a via MAPK levando à proliferação e diferenciação celular (Marrero, Fulton et al. 2004). Por outro lado, as respostas da Ang II nas células vasculares são mediadas por vários e complexos sistemas efetores presentes na membrana plasmática, tais como: fosfolipases (A, C e D), adenilciclase, PKC e canais iônicos. Essas vias proximais levam a ativação de cascatas semelhantes, que juntas, promovem a ativação nuclear de genes que promovem a proliferação celular (Watanabe, Barker et al. 2005). Tallant e Clark em 2003 demonstraram justamente que os efeitos antiproliferativos da Ang-(1-7) no músculo liso vascular estão relacionados com a inibição da atividade da ERK1/2 (p44/42 MAPK), ou

seja, a Ang-(1-7) poderia contraregular molecularmente os efeitos da Ang II e insulina na via proliferativa.

Recentemente foi demonstrado que, além da via clássica dependente de cálcio, a formação de óxido nítrico pode ser modulada através da fosforilação direta de aminoácidos específicos da sintase de NO endotelial. A fosforilação da serina 1177 pela proteína quinase B/Akt aumenta a atividade enzimática e a produção de NO (Fulton, Gratton et al. 1999). Alguns dados na literatura sugerem que a Ang II, agindo em receptor AT<sub>1</sub>, inibe a ação vascular da insulina interferindo na sua via metabólica reduzindo a fosforilação da via PI3K/Akt, reduzindo assim a disponibilidade de NO. Essa alteração na via da PI3K também altera a captação da glicose uma vez que essa via é responsável pela translocação do transportador Glut4 do citoplasma de células insulino-dependentes para a membrana. Também já foi demonstrado que o aumento dos níveis de Ang II está associado à alteração no GLUT4.

Sampaio e colaboradores (Sampaio, Souza dos Santos et al. 2007) mostraram que o eixo Ang-(1-7)/Mas, ativa a via da Akt que, por sua vez, pode inibir a via MAPK estimulada pela insulina. No entanto, não existe nenhum dado sobre a possível influência do eixo Ang-(1-7)/Mas, no metabolismo glicêmico e lipídico.

#### **2.4 Ratos Transgênicos TGR-L3292 e TetO-L8429**

O rato é um modelo animal preferível em várias áreas de pesquisa incluindo biologia cardiovascular e neural. Entretanto, devido à ausência de tecnologias genéticas para essa espécie, o rato perdeu prestígio nas duas

últimas décadas como modelo experimental quando comparado ao camundongo (Aitman, Critser et al. 2008) O advento da tecnologia de RNA interference (RNAi) tem aberto novas rotas para a técnica de knockdown em mamíferos. Tem-se utilizado a microinjeção pronuclear, que é uma metodologia bem estabelecida para a produção de espécies com knockdown genético induzido pelo “short hairpin RNA” (shRNA) (Popova, Bader et al. 2005). O rato transgêncio TetO-L8429 foi produzido utilizando tal técnica para produzir um constructo composto por um promotor inespecífico H1, bloqueado pela inserção de um operador (tetO) controlado por um repressor de tetraciclina (tetR) e expressão simultânea constante de um códon-otimizado tetR. Em seguida foi inserida a seqüência do mRNA do receptor de insulina (IR), criando assim um modelo, induzível e reversível, de diabetes melito resistente à insulina (Kotnik, Popova et al. 2009).

Quando liberada pelo tratamento com doxaciclina (DOX), a expressão generalizada do shRNA induz knockdown efetivo do receptor de insulina em todos os tecidos examinados produzindo resistência à insulina e diabetes melito. Todos os efeitos são reversíveis após a parada do tratamento com DOX (Kotnik, Popova et al. 2009).

Outro modelo produzido com o intuito de estudar os efeitos crônicos da Ang-(1-7), foi o TGR-L3292. Esse rato possui expressão gênica desse heptapeptídeo de forma independente da cascata de reações do SRA, devido a inserção de um constructo especial produzido no MDC-Berlin (Santos, Ferreira et al. 2004). A análise dos níveis circulantes de Ang-(1-7) mostrou que esse animal apresenta um aumento plasmático de aproximadamente 2.5 vezes desse peptídeo. O constructo responsável por tal aumento foi produzido utilizando um

promotor inespecífico citomegalovirus (CMV), um segmento de pró-renina, um sítio de clivagem para furina e a seqüência de codons que codifica a seqüência de peptídeos da Ang-(1-7) (Santos, Ferreira et al. 2004). A análise da expressão do constructo em diversos tecidos mostrou que este está ativo apenas no testículo desses animais, fazendo com que este órgão funcione como uma bomba biológica que secreta Ang-(1-7) diretamente na circulação (Santos, Ferreira et al. 2004).

Em resumo, as técnicas de manipulação genética para ratos transgênicos propiciou a produção de dois modelos importantes para o estudo do diabetes associado à resistência a insulina e das funções do aumento crônico dos níveis circulantes de Ang-(1-7).

## **2.5 Primeira etapa- Avaliação Metabólica do camundongo Knockout Mas FVB/N**

A primeira etapa desse trabalho visando a avaliação do papel da Ang-(1-7) no metabolismo teve início no ano de 2006 durante o mestrado e consistiu na avaliação do perfil glicêmico e lipídico do animal knockout para o receptor Mas da linhagem FVB/N (Santos 2007; Santos, Fernandes et al. 2008).

Para análise deste modelo foram construídas curvas de glicemia pelo tempo após a aplicação intraperitoneal de insulina (0.75U/Kg) ou glicose (2g/Kg). Após o sacrifício os tecidos foram pesados e reservados para análises moleculares. O perfil lipídico e os níveis plasmáticos de leptina e adiponectina foram avaliados utilizando kits de ELISA e a expressão do mRNA dos genes de TGF- $\beta$ , angiotensinogênio e do TNF- $\alpha$  foram analisados pela técnica de Real-



Time PCR e o Glut4, por sua vez, pela técnica de western blotting (Santos, Fernandes et al. 2008).

Como resultado, observamos que apesar desse modelo apresentar peso corporal igual ao do controle ( $24.7 \pm 0.35$  vs  $24.8 \pm 0.24$  g no WT), os camundongos *Mas*<sup>-/-</sup> jovens possuem um aumento marcante no peso do tecido adiposo epididimal ( $1.704 \pm 0.1516$  vs  $1.150 \pm 0.1259$  % do PC no WT) e retroperitoneal ( $0.6747 \pm 0.08576$  vs  $0.3781 \pm 0.04575$  % do PC no WT). Além disso, esses animais apresentam resistência à insulina e maior intolerância a glicose, bem como um aumento na glicemia de jejum ( $86.6 \pm 6.43$  vs  $56.40 \pm 4.98$  mg/dl no WT). Também foram encontrados aumentos significativos nos níveis plasmáticos de colesterol total ( $92.2 \pm 3.65$  vs  $74.6 \pm 5.67$  mg/dl no WT) e triglicérides ( $70.6 \pm 13.3$  vs  $41.4 \pm 4.07$  mg/dl no WT). Parte dessas alterações podem ser explicadas pelo aumento nos níveis séricos de leptina ( $1.3 \pm 0.25$  vs  $0.73 \pm 0.17$  ng/ml no WT) e pela diminuição na expressão protéica do transportador Glut-4 no tecido adiposo epididimal dos *Mas*<sup>-/-</sup>. Observamos uma expressão aumentada do RNA mensageiro dos genes de TGF- $\beta$  e angiotensinogênio no tecido adiposo, enquanto a expressão do TNF- $\alpha$ , o consumo de comida e os níveis plasmáticos de adiponectina, não se alteraram. Juntos, esses dados indicam um importante papel do receptor Mas na função cardiovascular e metabólica em camundongos FVB/N mostrando que os camundongos knockout Mas são um modelo animal que mimetiza o quadro de síndrome metabólica (Santos, Fernandes et al. 2008).

Mediante os resultados obtidos as principais questões propostas para continuação do estudo foram avaliar se o aumento crônico dos níveis circulantes de Ang-(1-7) podem gerar algum efeito benéfico sobre o metabolismo glicêmico

e lipídico ou até mesmo se seria capaz de reverter algum estado associado a doenças onde ocorra desregulação metabólica.

***OBJETIVO***

---

### **3- OBJETIVO**

Dentro do contexto apresentado, o objetivo geral do nosso trabalho foi avaliar o perfil lipídico e glicêmico dos ratos transgênicos TGR-L3292, que apresentam um aumento crônico de 2,5 vezes nos níveis circulantes de angiotensina-(1-7), bem como avaliar o efeito do tratamento oral com angiotensina-(1-7) incluída em beta-ciclodextrina em ratos transgênicos TetO-29, modelo de diabetes melito do tipo 2, induzível por tetraciclina (TetO-sensíveis).

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Drogas utilizadas no tratamento

- Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Cerestar),
- Ang-(1-7) (Bachem) incluída em Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina – Laboratório do Prof. Ruben Sinisterra, Depto. Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG .
- Doxíciclina (Sigma)

### 4.2 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos transgênicos machos da linhagem TGR-L3292, que possuem um aumento de 2,5 vezes nos níveis circulantes de angiotensina-(1-7) (Santos, Ferreira et al. 2004), e seus controles Spraguey Dowley (SD), bem como ratos transgênicos machos da linhagem TetO-L8429, (TetO-29) produzido pela técnica de *RNA Interference-shRNA* para o gene do receptor de insulina, com um sítio sensível a tetraciclina (TetO induzível) tendo sido caracterizado como modelo de diabetes melito do tipo 2 (Kotnik, Popova et al. 2009), e seus controles Spraguey Dowley (SD). Todas as matrizes foram produzidas no Max-Delbrück-Center For Molecular Medicine-MDC (Berlin-Buch, Alemanha). Os animais utilizados foram machos adultos com idade acima de 12 semanas, sendo todos tratados com dieta comercial e com livre acesso à água. Durante os experimentos, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h) com temperatura de  $25 \pm 2,0$  °C. Os animais da linhagem TetO-L8429 e seus controles foram tratados por 72 dias com doxáciclina e

angiotensina-(1-7), de forma intermitente, com medidas diárias dos níveis glicêmicos, volume de ingestão de água e peso corporal utilizando balança semi-analítica e proveta única para aferição do volume de água.

### **4.3 Tratamento**

Um total de 10 ratos transgênicos TetO-29, knockdown para o receptor de insulina, foram divididos em dois grupos intitulados TetO-Ang-(1-7) e TetO-HPBCD. Concomitantemente um grupo controle composto por 6 animais SD também foi separado. Todos os ratos foram tratados, inicialmente, com doxamiclina oferecida na água de beber, na concentração de 5 µg/ml (dose de ataque). Quando todos os animais atingiram uma concentração plasmática de glicose em torno de 300 mg/dl o tratamento foi interrompido até a glicemia retornar aos seus valores basais. Em seguida o tratamento com a dose de ataque foi reiniciado (restart), sendo essa dose mantida até que os níveis plasmáticos de glicose ultrapassassem a concentração de 150 mg/dl, com posterior redução da dose para 1 µg/ml (dose intermediária), observando-se o volume de ingestão de água diário, até o momento em que esse valor ultrapassou 80 ml por dia. A partir de então a concentração de doxamiclina passou a ser calculada individualmente e diariamente, com base no peso corporal e no volume de ingestão hídrico do dia anterior, de forma que a concentração foi mantida em torno de 0,1 µg/g de peso corporal (dose padrão) até o fim do tratamento.

Durante a fase de “restart” do tratamento os animais do grupo TetO-Ang-(1-7) passaram a ser tratados diariamente, por gavagem, com angiotensina-(1-7) incluída em beta-ciclodextrina (composto de inclusão-CI), inicialmente na

concentração de 30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal, e o grupo TetO-HPBCD tratado com a mesma dosagem de beta-ciclodextrina (controle-veículo). Essa concentração foi mantida até o quadragésimo terceiro dia de tratamento, quando o tratamento foi interrompido para que os níveis glicêmicos dos dois grupos se iguallassem. Desta forma, no setuagésimo dia, o tratamento com o composto de inclusão e a beta-ciclodextrina foi retomado nos seus respectivos grupos, porém agora na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , permanecendo assim até o fim do protocolo. A seqüência de tratamento é resumida abaixo:

|             |                |   |             |  |
|-------------|----------------|---|-------------|--|
| Doxaciclina | Sem Tratamento | Doxaciclina+ Ang-(1-7) 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ | Doxaciclina | Doxaciclina+ Ang-(1-7) 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ |
|-------------|----------------|---|-------------|--|

Os animais da linhagem TGR-L3292 e seus controles SD não passaram por nenhum tratamento prévio.

#### 4.4 Amostras de sangue

Para todos os animais TGR-L3292 e seus controles e para os TetO-29 e controles ao término do tratamento [referente a dose de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  PC de Ang-(1-7)], a coleta de sangue se deu após jejum de 10 a 12 horas sendo as amostras coletadas por decapitação em guilhotina. Os animais TetO-29 também tiveram amostras de sangue coletadas durante o período de tratamento [referente a dose de 30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  PC de Ang-(1-7)], após anestesia com éter etílico. Todas as amostras tiveram o soro separado por centrifugação a 3500 rpm/ 10 minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243).



#### **4.5 Peso Corporal e peso adiposo**

Para determinação da massa corporal todos os animais foram pesados ao início de cada protocolo e diariamente para os ratos TetO-29 e seus controles.

Para avaliação da massa adiposa, após o sacrifício por decapitação (como descrito), o tecido adiposo epididimal e o retroperitoneal foram retirados, pesados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. O peso do tecido adiposo foi então corrigido pelo peso corporal.

#### **4.6 Ingestão alimentar , consumo de água e diurese**

A ingestão alimentar foi medida durante uma semana 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 de comida ingerida foi corrigida pelo peso corporal do animal. A média dos valores encontrados é apresentada em gráfico.

Para os ratos TetO-29 e seus controles o volume de consumo de água foi medido diariamente a cada 24 horas com o auxílio de uma proveta única e específica durante todo o período de tratamento. Ao decorrer da última semana de experimentação os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais a fim de se avaliar a diurese, sendo o volume urinário medido após 24 horas de enclausuramento.

#### **4.7 Determinação dos níveis plasmáticos de leptina e adiponectina**

Os níveis séricos de leptina (Linco Research<sup>®</sup> ; Missouri USA), adiponectina (AdipoGen<sup>®</sup>, Seoul Korea) e insulina (Linco Research<sup>®</sup> ; Missouri

USA), foram avaliados utilizando kits de ELISA específicos, de acordo com as especificações do fabricante (Bradford 1976).

#### **4.8 Determinação dos níveis de colesterol total**

Os níveis de colesterol total foram mensurados de acordo com o método da colesterol oxidase , utilizando-se kit comercial da empresa Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima em 505 nm. Os níveis de colesterol no soro dos animais foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços. Em suma, 10 µL das amostras de soro foram diluídas em água destilada (1:100), a fim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. À diluição, foram adicionados 100 µL de reagente de colesterol total. Após um período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Thermo Plate).

#### **4.9 Determinação de colesterol HDL**

Os níveis de colesterol HDL no soro foram dosados por meio do kit enzimático Doles, Brasil. O princípio se baseia na precipitação seletiva de LDL e VLDL por polietilenoglicol tamponado restando apenas a fração HDL no sobrenadante. Essa amostra foi separada para a dosagem de HDLc da seguinte forma: em uma microplaca de 96 poços 10 µL da amostra foram adicionados a

200 µL do reagente de cor Colesterol 250 Doles/Colesterol Enzimático Líquido Doles. Após uma incubação de 10 minutos a 37°C, a absorvância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

#### **4.10 Determinação dos níveis de triglicerídeos**

Os níveis de triglicerídeos séricos foram medidos de acordo com o método enzimático colorimétrico, utilizando kit comercial da empresa Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase que em presença de oxigênio produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase do reagente fenólico (p-clorofenol) e da 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com máximo de absorção a 500 nm.

As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas conforme descrito anteriormente para o colesterol.

#### **4.11 Histologia de tecido adiposo e renal**

Após o sacrifício uma amostra do tecido adiposo epididimal foi separada e fixada em Bouin em um volume 10x maior que o volume tecidual. Simultaneamente um dos rins foi fixado em formalina 10%. Após 24 horas os tecidos foram transferidos para uma solução de álcool etílico 70% onde permaneceram até o momento da inclusão em parafina. Em seguida foram feitos cortes de 7 µm de espessura para o tecido adiposo e 5 µm para o rim, em micrótomo específico, com posterior montagem em lâminas de vidro previamente preparadas. Cada lâmina recebeu um total de 3 cortes retirados do bloco de

parafina com uma distância mínima de 20  $\mu\text{m}$ . As lâminas do tecido adiposo foram coradas pelo método de HE (hematoxilina-eosína) e as lâminas do rim com HE e sirius red . A análise foi feita em microscópio acoplado à câmera digital em um aumento de 20x. Para o tecido adiposo foram selecionados três campos por corte medindo-se o diâmetro de 20 adipócitos em cada campo. Foram analisados no mínimo 540 adipócitos por animal fazendo-se a posteriori a média dos resultados encontrados por animal para realização da análise.

## **4.12 Retrotranscrição e Real Time PCR**

### **4.12.1 Extração de RNA total**

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método “guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio”. Após o sacrifício os órgãos de interesse foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido com subsequente armazenagem à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram então homogeneizadas em tubos plásticos de 5 mL contendo o reagente TRIzol<sup>®</sup> (0,1 g de tecido/1,0 mL do reagente extrativo; Invitrogen, USA), utilizando-se o homogeneizador de tecido PowerGen 700 (Ficher, USA). Os recipientes plásticos contendo o homogenato foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio (Merck<sup>®</sup>, USA). Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em tubos para microcentrífuga com subsequente adição de 0,5 mL de isopropanol. O material foi levemente agitado e mantido em repouso a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 10

minutos. Após nova centrifugação (12.000 rpm por 10 minutos) à mesma temperatura utilizada anteriormente, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% (V/V), gelado (solução manufaturada em água tratada com dietil-pirocarbonato - DEPC), agitando-se novamente. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente até completa secagem das amostras. A ressuspensão do RNA total foi realizada com adição de 0,05 mL de água tratada com DEPC.

#### **4.12.2 Eliminação de moléculas de DNA genômico**

Para eliminação de uma possível contaminação com o DNA genômico nas amostras de RNA total foi utilizada a enzima desoxiribonuclease I proveniente da empresa GibcoBRL<sup>®</sup>. O tratamento foi feito de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

#### **4.12.3 Quantificação do RNA total**

Após os procedimentos descritos anteriormente as amostras de RNA total foram diluídas 50X e estimou-se a concentração em espectrofotômetro a 260 nm (HITACHI<sup>®</sup> UV 160 A) com leitura paralela a 280 nm para avaliação de contaminantes. O cálculo da concentração do nucleotídeo foi realizado utilizando a seguinte equação:  $[RNA_{total}] = A_{260} \times 40 \times \text{Fator de diluição}$ , sendo o resultado expresso em  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.12.4 RT (Transcrição Reversa)

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA (DNA complementar) num volume final de 30  $\mu$ L. Foram utilizados 1  $\mu$ g de RNA total, 0,2  $\mu$ g de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH 8,3; KCl 68 mM), 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 UI de transcriptase reversa. Reagentes da empresa Promega<sup>®</sup> Corporation (USA). O cDNA foi sintetizado em termociclizador durante um período de 60 minutos de incubação a 37 °C. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min.

#### 4.12.5 PCR Quantitativa

As reações de PCR quantitativa foram feitas utilizando “*primers*” específicos para o cDNA dos genes de interesse. A análise dos pares de bases foi executada com o auxílio do programa específico BLASTN com posterior síntese pela empresa Invitrogen<sup>®</sup> (Tabela 6). Alíquotas na concentração de 150  $\mu$ M foram feitas e estocadas em freezer a -20° C. Uma subsequente diluição para 1nmol/ $\mu$ l foi necessária para uso. Os *primers* do gene utilizado para normalização da reação (controle endógeno) foram de GAPDH.

O cDNA obtido na etapa de RT (2  $\mu$ l ) foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR. As reações de PCR quantitativo foram realizadas num volume final de 25  $\mu$ l em duplicatas, utilizando-se 19  $\mu$ l do Máster Mix de SYBR Green (Applied Biosystem-USA), 2  $\mu$ l de cada *primer* na concentração de 1nmol/ $\mu$ l, e 2  $\mu$ l do cDNA obtido na etapa anterior. O aparelho utilizado para reação foi o ABI Prism 7000 (Applied Biosystem, EUA), sendo totalizados 45 ciclos à temperatura de anelamento específica.

**Tabela 2.** Primers e condições experimentais utilizadas para o Real Time PCR

| Alvo          | Seqüência (5' para 3') Sense   | Seqüência (5' para 3') Antisense | Temperatura de anelamento (°C) | Ciclos |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------|
| TNF- $\alpha$ | TGC CTC AGC CTC<br>TTC TCA TT  | CCC ATT TGG GAA<br>CTT CTC CT    | 60                             | 45     |
| TGF- $\beta$  | AAA CGG AAG CGC<br>ATC GAA     | GGG ACT GGC GAG<br>CCT TAG TT    | 60                             | 45     |
| AGT           | ACA CCC CTG CTA<br>CAG TCC AC  | ACC CCC TCT AGT<br>GGC AAG TT    | 60                             | 45     |
| Adiponectina  | CTC CAC CCA AGG<br>AAA CTT GT  | CTG GTC CAC ATT<br>TTT TTC CT    | 60                             | 45     |
| aP2           | AGC GTA GAA GGG<br>GAC TTG GT  | ATG GTG GTC GAC<br>TTT CCA TC    | 60                             | 45     |
| GAPDH         | AAC GAC CCC TTC<br>ATT GAC CTC | CTT CCC ATT CTC<br>AGC CTT GAC T | 60                             | 45     |

#### 4.13 Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais os tecidos, previamente removidos e estocados no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram homogeneizados em 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (1% Triton X-100, 0,15M NaCl, 20mM de Tris HCl, pH 7.0, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM  $\text{CaCl}_2$ , , 4 $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina, 4 $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina, 1mM de orthovanadato de sódio, 0,5 mM PMSF).

Após centrifugação, as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida o lisado obtido foi coletado e centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em uma centrífuga Eppendorf modelo 5417R. O sobrenadante

foi coletado e a concentração das proteínas totais determinada pela técnica espectrofotométrica de Bradford .

Uma curva padrão da concentração de proteínas (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) vs absorvância foi construída utilizando albumina de soro bovino (BSA).

Utilizou-se 25  $\mu\text{L}$  de cada ponto da curva adicionados de 2 mL da solução Coomassie Blue. As amostras foram diluídas na proporção de 1:5 (5  $\mu\text{L}$  de amostra, acrescidos 20  $\mu\text{L}$  de água milipore).

Após a adição de 2 ml de Coomassie Blue, as amostras e a curva padrão foram agitadas e deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente mensurou-se a absorvância de cada amostra sob o comprimento de onda de 595 nm. A concentração protéica da amostras foi calculada a partir da curva absorvância pela concentração protéica obtida da curva padrão.

#### **4.14 Western Blotting**

Trinta  $\mu\text{g}$  dos extratos protéicos foram fracionados em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 12% a 100V por 1,5 h em fonte PowerPac da Bio Rad. Após a corrida eletroforética as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram então coradas com "Ponceau" para verificar a eficiência da transferência. Após esta etapa as membranas foram lavadas com Tris-Base 1M pH 7,6 (1x) contendo 0,1% de Tween (TBS-T) até se retirar todo o Ponceau. Em seguida as ligações não específicas foram bloqueadas com TBS 1x, contendo 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente ao bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo



primário 1/1000 em TBS-T contendo 1% de leite em pó, por 18 horas a 4°C. Foram utilizados anticorpos primários comerciais para todas as proteínas testadas. As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-T e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-coelho diluído em TBS-T contendo 1% de BSA. Após este tempo as membranas foram lavadas mais três vezes com TBS-T e incubadas por 5 minutos com solução reveladora. O excesso da solução foi retirado e as membranas foram expostas contra filme de raio X por diferentes tempos. Os filmes foram revelados utilizando-se soluções reveladoras e fixadoras (Kodac-USA), seguindo-se as instruções do fabricante.

#### **4.15 Testes de Tolerância à Glicose e Sensibilidade Insulínica**

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

O teste de sensibilidade insulínica foi realizado pela manhã, 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 cauda do animal, coletou-se uma gota de sangue para verificação da glicemia no momento anterior à aplicação de insulina e com 15, 30 e 60 minutos decorridos da aplicação. O aparelho utilizado para leitura glicêmica foi o Accu-Chek® Advantage (Roche). Com os resultados construiu-se uma curva de glicemia pelo tempo.

O teste de tolerância à glicose foi realizado pela manhã, com os animais em jejum de 12 horas, através da aplicação intraperitoneal de 2 g de glicose/kg

de peso corporal. Após um pequeno corte na ponta da cauda do animal coletou-se uma gota de sangue para verificação da glicemia no momento anterior à aplicação da glicose (glicemia de jejum) e com 15, 30, 60 e 120 minutos decorridos da aplicação. O aparelho utilizado para leitura glicêmica foi o Accu-Chek® Advantage (Roche). A partir dos resultados construiu-se uma curva de glicemia pelo tempo (Lee, Villena et al. 2003).

#### **4.16 Captação de Glicose**

O 2-deoxy-[<sup>3</sup>H]glucose (2DOG) é transportado, fosforilado mas não oxidado pelos adipócitos. Conseqüentemente ele se acumula na forma de 2DOG-fosfato dentro da célula. A radioatividade acumulada nos adipócitos pode ser utilizada para avaliar a capacidade de captação de glicose dentro deste tipo celular.

*Isolamento do adipócito.* Adipócitos de ratos SD e TGR-L3292 foram isolados do tecido adiposo epididimal de acordo com a técnica de Rodbell. O tecido foi digerido com colagenase a temperatura de 37°C em um “shake” com movimentos constantes por 45 minutos. Em seguida, as células foram filtradas em uma malha de “nylon” com espessura de 300 µm e lavadas três vezes com um tampão contendo (mM): 137 NaCl, 5 KCl, 4.2 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 HEPES (pH 7.4) and 1 % BSA.

*Protocolo de Transporte de Glicose.* Após isolamento, os adipócitos foram incubados em banho por 45 min a temperatura de 37°C, na presença e na ausência de insulina (25ng/mL). A captação de 2-DOG foi utilizada para

determinar a taxa do transporte como descrito previamente. Rapidamente a captação de glicose foi iniciada pela adição de 2-DOG (0.2  $\mu$ Ci/tubo) por 3 minutos. Na seqüência as células foram separadas por centrifugação com o auxílio de óleo de silicone e a radioatividade foi determinada pela contagem da cintilação. A associação não específica de 2-deoxy-[ $^3$ H]glucose foi determinada por realização de incubações paralelas na presença de 15 mM de floretina. O valor obtido foi subtraído dos valor do transporte de glicose em cada condição. Ao final da análise a diferença entre a captação basal (sem estímulo por insulina) e a estimulada por insulina foi calculada para cada animal afim de demonstrar a capacidade de resposta a esse estímulo (sensibilidade insulínica *In Vitro*).

#### **4.17 Glicogênio Muscular**

O glicogênio muscular foi extraído de acordo com Sjörgren e colaboradores (Sjörgren B. 1938), e determinado como glicose seguida de hidrólise ácida. Amostras do tecido muscular foram colocadas em tubos com KOH 30% saturado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Os tubos foram colocados em banho de água quente por uma hora até que uma solução homogênea fosse obtida, sendo imediatamente incubados em gelo. Posteriormente, adicionou-se etanol absoluto para precipitar o glicogênio da digestão alcalina. As amostras foram deixadas em gelo por 10 minutos e então centrifugadas a 840 rpm por 20 minutos. O supernadante foi cuidadosamente aspirado e o glicogênio lavado com água destilada e precipitado novamente com etanol. O glicogênio precipitado foi dissolvido em 3 ml de água destilada e subseqüentemente transferido para um balão volumétrico de 10 ml sendo diluído. O conteúdo do frasco foi homogeneizado e uma parte foi então novamente diluída em água utilizando-se

um segundo balão até que a concentração de glicogênio estivesse entre 3-30 mg/ml. Na seqüência, adicionou-se antrona cuidadosamente às alíquotas de 2 ml da diluição final (em gelo) e os tubos foram então colocados em banho de água quente por 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, a absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. A curva de calibração foi montada com glicose em diferentes concentrações.

#### **4.18 Análises estatísticas e expressão dos resultados**

Para análise dos dados do teste de sensibilidade insulínica e tolerância a glicose foi utilizada a análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida do teste de comparação entre curvas do tipo “BONFERRONI”. Os demais resultados obtidos foram analisados através de teste T de Student não pareado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estaticamente significativos.

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism<sup>®</sup> 4.0 (San Diego, CA, USA).

## ***RESULTADOS***

---

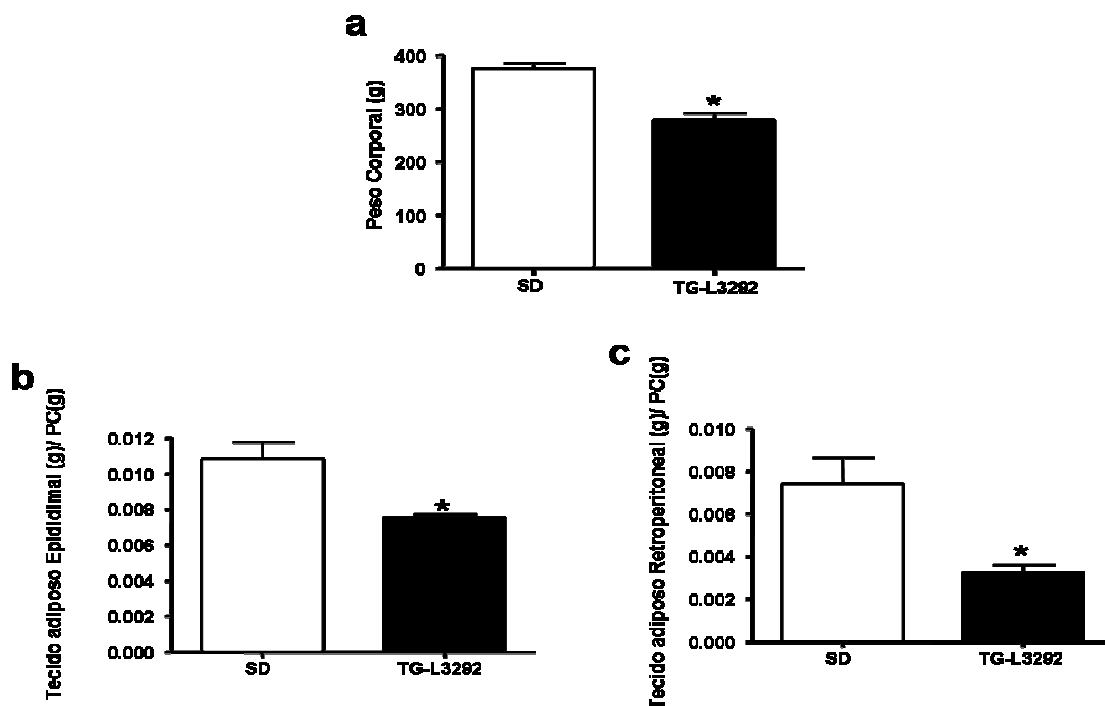
## 5- Resultados

### 5.1 Ratos TGR-L3292

#### 5.1.1 Peso corporal e peso adiposo

A análise do peso corporal mostrou que os animais da linhagem TGR-L3292 possuem uma diminuição na massa corpórea ( $278.3 \pm 13.3$ g no TGR-L3292 vs.  $375.7 \pm 10.2$  g nos ratos SD). A figura 4 ilustra os resultados obtidos.

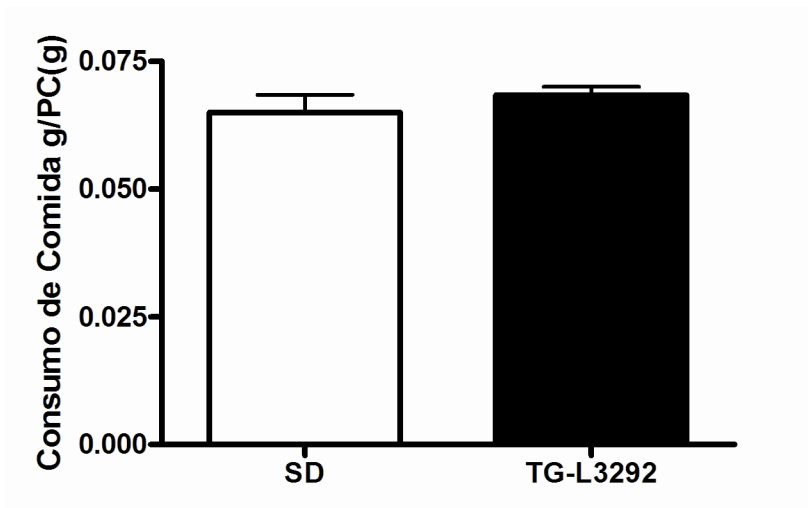
Após coleta e pesagem do tecido adiposo observou-se uma diminuição da massa adiposa relativa, tanto epididimal ( $0.00752 \pm 0.00012$  g/PC no TGR-L3292 vs.  $0.01082 \pm 0.00095$  g/PC nos ratos SD) (Figura 4 B) quanto retroperitoneal ( $0.00325 \pm 0.00035$  g/PC no TGR-L3292 vs.  $0.00740 \pm 0.00125$  g/PC nos ratos SD) (Figura 4C), nos animais da linhagem TGR-L3292. A figura 4 mostra os gráficos da massa adiposa de ambos os grupos corrigidos pelo peso corporal.



**Figura 4** – Peso corporal e peso do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos animais TGR-L3292 (n=12) e SD (n=12). (A) Peso Corporal; (B) Peso do tecido adiposo epididimal em g corrigido pelo peso corporal em g (C) Peso do tecido adiposo retroperitoneal em g corrigido pelo peso corporal em g. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significante  $p < 0.05$ .

### 5.1.2 Ingestão alimentar

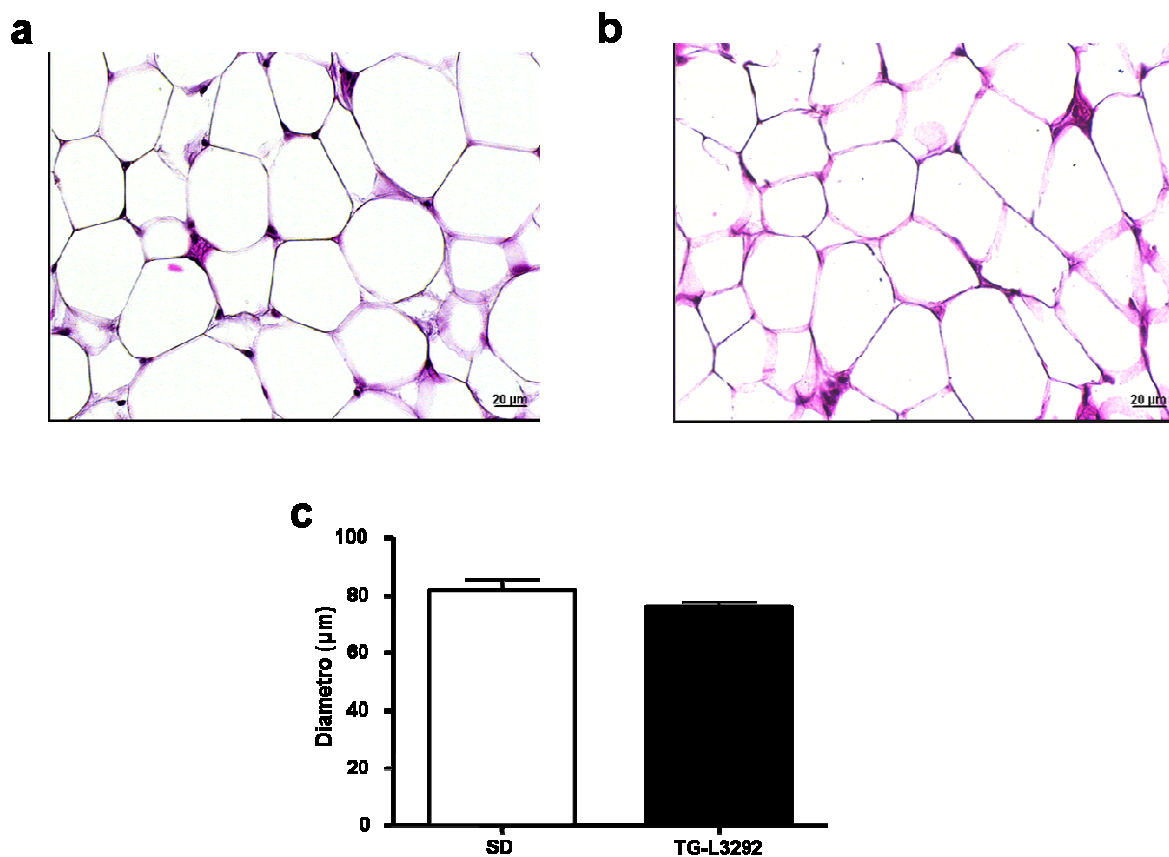
A ingestão de ração (quantidade de comida ingerida por peso corporal) não diferiu entre os grupos ( $0.0683 \pm 0.0017$  g/PC em g no TGR-L3292 vs.  $0.0650 \pm 0.0034$  g/PC em g nos ratos SD), como mostrado na figura 5.



**Figura 5** – Massa de comida ingerida corrigida pelo peso corporal dos animais TGR-L3292 (n=6) e SD (n=6). Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*.

### 5.1.3 Histologia do tecido adiposo epididimal

A medida do diâmetro de vinte adipócitos por campo (Figura 6C) não revelou diferença significativa entre os animais TGR-L3292 e SD ( $76.06 \pm 1.47 \mu\text{m}$  no TGR-L3292 vs.  $81.80 \pm 3.64$  nos ratos SD), indicando ausência de atrofia ou hipertrofia nas células adiposas dos animais transgênicos.

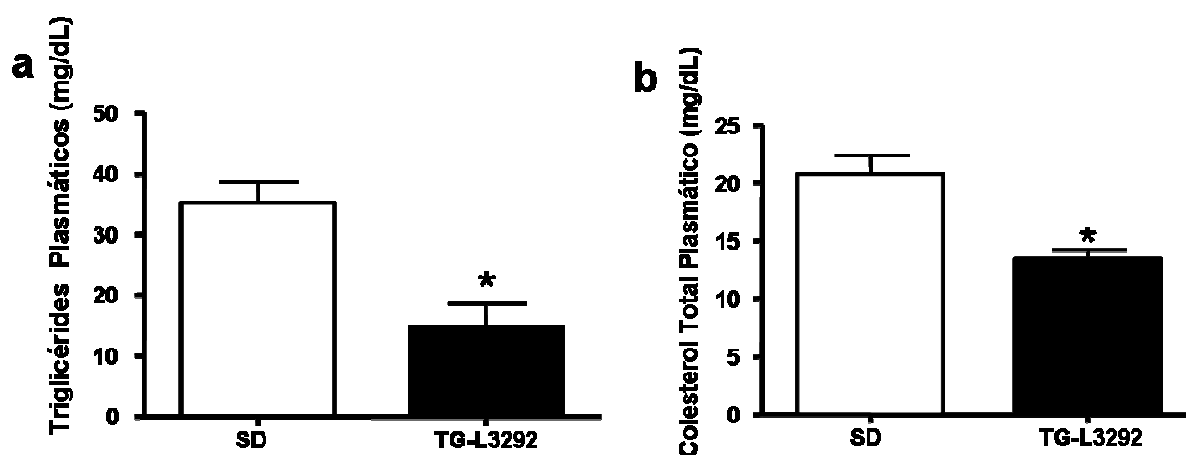


**Figura 6** – Análise histológica (HE) do tecido adiposo epididimal dos animais TGR-L3292 (n=5) e SD (n=5). (A) Foto ilustrativa do tecido adiposo epididimal dos ratos TGR-L3292. (B) Foto ilustrativa do tecido adiposo epididimal dos ratos SD. (C) Análise do diâmetro de 20 adipócitos por campo totalizando um mínimo de 540 adipócitos por animal. Os dados representam média ± EPM e foram analisados através do teste-T de Student



### 5.1.4 Perfil Lipídico

A dosagem plasmática do colesterol total ( $13.41 \pm 0.83$  mg/dl no TGR-L3292 vs.  $20.79 \pm 1.61$  mg/dl nos ratos SD), e dos triglicérides ( $14.82 \pm 3.77$  mg/dl no TGR-L3292 vs.  $35.22 \pm 3.39$  mg/dl nos ratos SD), mostrou que o rato transgênico TGR-L3292 possui uma importante redução dos níveis lipídicos, apresentando uma importante redução, com relação ao grupo controle, em ambas as análises (Figura 7).



**Figura 7** – Perfil lipídico dos ratos TGR-L3292 (n=7) e SD (n=7). (A) Dosagem dos níveis plasmáticos de triglicérides (B) Dosagem dos níveis plasmáticos de colesterol total. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

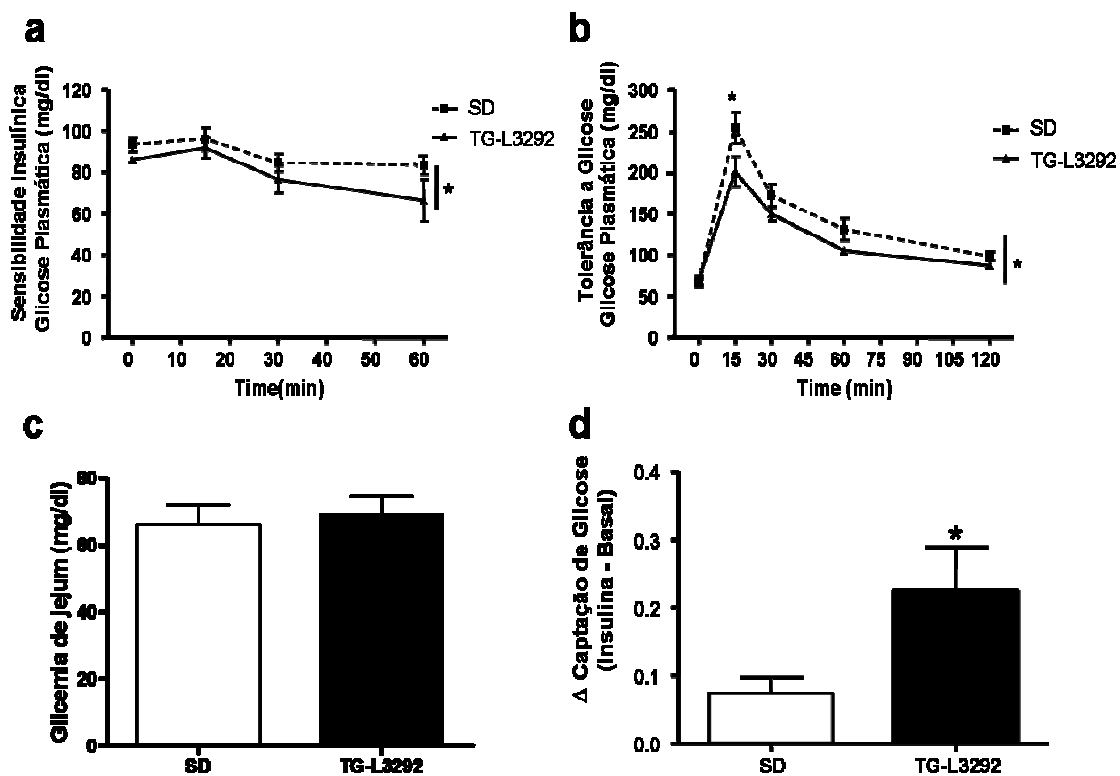
### 5.1.5 Perfil Glicêmico

O teste de tolerância à glicose mostrou que os animais TGR-L3292 apresentam uma maior tolerância à glicose quando comparados aos seus controles SD, apresentando diminuição mais rápida da glicemia após injeção intraperitoneal de D-glucose como mostrado na figura 8B, onde se observa diferença significativa entre as curvas dos grupos analisados. A glicemia basal de jejum não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $69.00 \pm 5.91$  mg/dl no TGR-L3292 vs.  $66.14 \pm 5.81$  mg/dl nos ratos SD) como mostrado na figura 8C.

O teste de sensibilidade insulínica mostrou que os animais TGR-L3292 apresentam maior sensibilidade a insulina quando comparados aos animais controle SD, apresentando uma queda maior da glicemia após injeção intraperitoneal de insulina, com menor aumento dos níveis glicêmicos durante o protocolo experimental. A figura 8A mostra uma diferença significativa entre as curvas dos grupos analisados.

Em ambos os testes a análise da área sob a curva da glicemia de cada animal, ao longo dos experimentos, mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos indicando uma melhor resposta metabólica do rato TGR-L3292 tanto ao estímulo insulínico quanto ao estímulo com glicose.

O teste *in vitro* da captação de glicose pelos adipócitos extraídos do tecido adiposo epididimal mostrou que os ratos da linhagem TGR-L3292 apresentam uma maior resposta do delta da captação de glicose quando estimulados pela insulina ( $0.2249 \pm 0.0644$  no TGR-L3292 vs.  $0.07383 \pm 0.0232$  nos ratos SD), como mostrado na figura 8D.

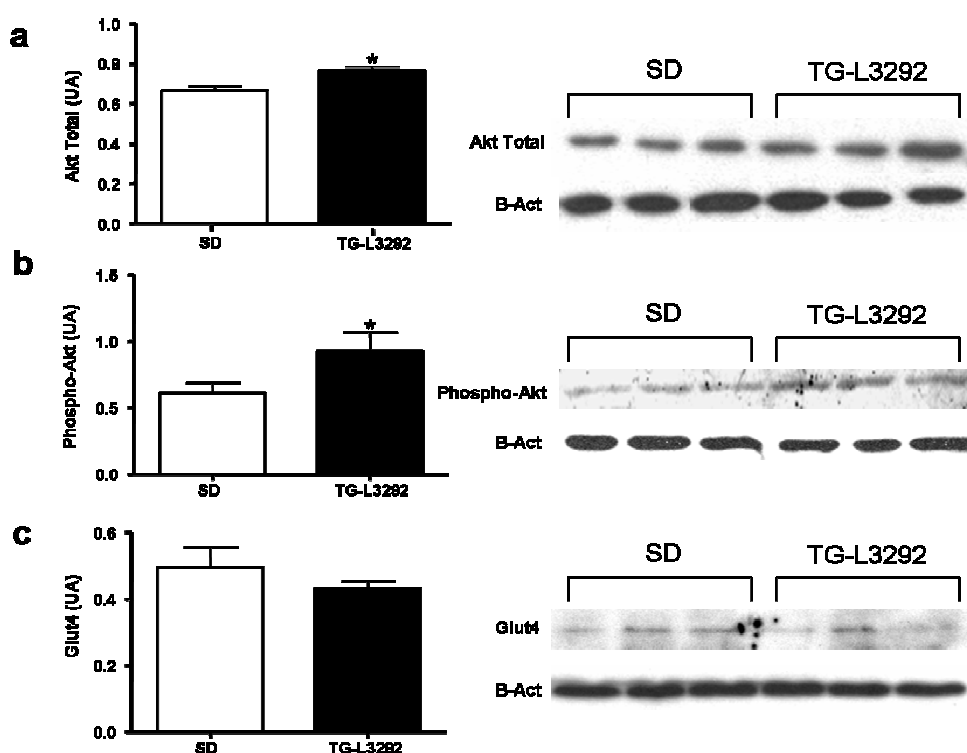


**Figura 8** – Perfil glicêmico dos ratos TGR-L3292 (n=7) e SD (n=7). (A) Teste de tolerância à glicose e gráfico da área sob a curva; (B) Teste de sensibilidade à insulina e gráfico da área sob a curva; (C) Glicemia de Jejum; (D) Delta da captação de glicose pelos adipócitos (valor após estímulo com insulina menos a captação basal). Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student* (8C e D) e *two-way ANOVA* (8A e B). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.1.6 Western Blotting do tecido adiposo

Para avaliação da atividade da via metabólica insulínica analisamos os níveis de Akt total ( $0.7650 \pm 0.0198$  UA no TGR-L3292 vs  $0.6661 \pm 0.0220$  UA nos ratos SD) e fosforilado ( $0.9260 \pm 0.141$  UA no TGR-L3292 vs  $0.6081 \pm 0.081$  UA nos ratos SD) no tecido adiposo epididimal dos ratos TGR-L3292 e SD. Os resultados mostraram um aumento discreto, porém significativo, nas duas formas de Akt consideradas (figura 9 A e B).

A análise dos níveis protéicos do transportador de glicose Glut4, no tecido adiposo epididimal, não mostrou diferença significativa ( $0.4024 \pm 0.035$  UA no TGR-L3292 vs  $0.4953 \pm 0.0809$  UA nos ratos SD) na expressão desse receptor nos animais TGR-L3292 com relação aos controles SD (Figura 9 C).

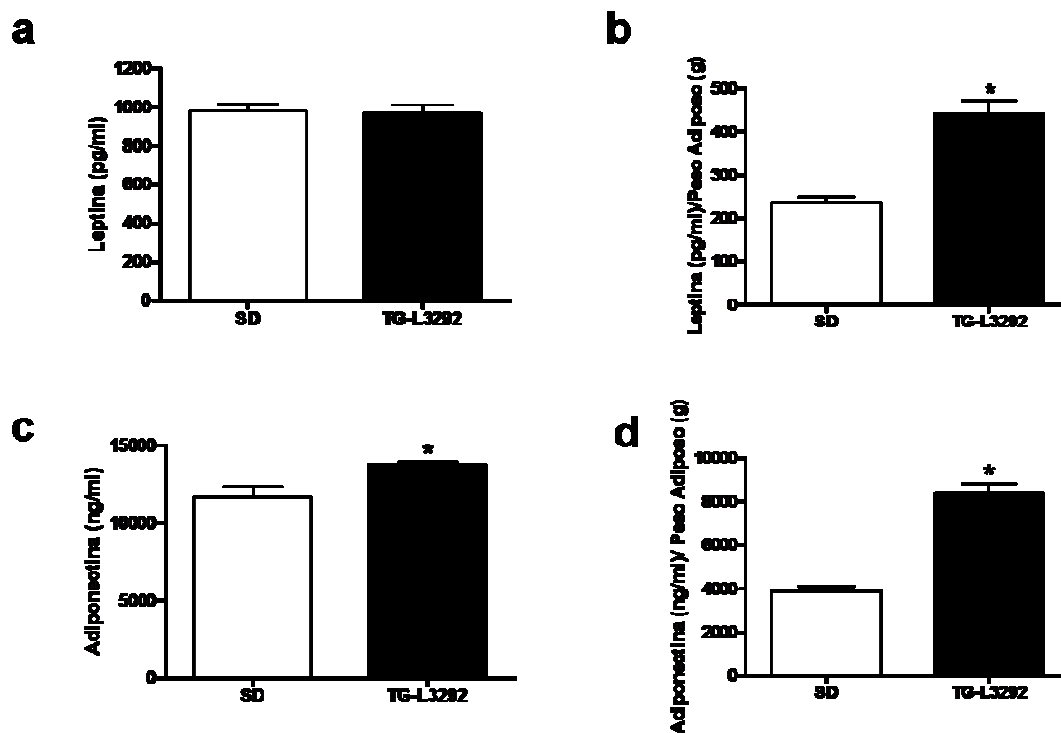


**Figura 9** – Western Blotting de amostras de tecido adiposo epididimal de ratos TGR-L3292 (n=6) e SD (n=6), com fotos ilustrativas do filme de revelação do western blotting. (A) Análise protéica do Akt/PKB total e foto ilustrativa da revelação. (B) Análise protéica do Akt/PKB fosforilado e foto ilustrativa da revelação. (C) Análise protéica do transportador de glicose Glut4 e foto ilustrativa da revelação. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.1.7 Dosagem dos níveis séricos de adipocinas

A dosagem plasmática dos níveis de leptina mostrou não haver diferença entre os níveis circulantes dos animais TGR-L3292 e seus controles SD ( $968.8 \pm 44.1$  pg/ml no TGR-L3292 vs  $977.4 \pm 41.21$  pg/ml nos ratos SD) como mostrado na figura 10A. No entanto, em situações normais os níveis circulantes de leptina são diretamente proporcionais à massa de tecido adiposo. Quando corrigimos a massa adiposa pelos níveis plasmáticos de leptina observamos que os ratos da linhagem TGR-L3292 possuem uma produção por adipócito mais elevada que o grupo SD controle ( $441.2 \pm 31.44$  pg/ml no TGR-L3292 vs  $235.7 \pm 15.21$  pg/ml nos ratos SD) como representado na figura 10B.

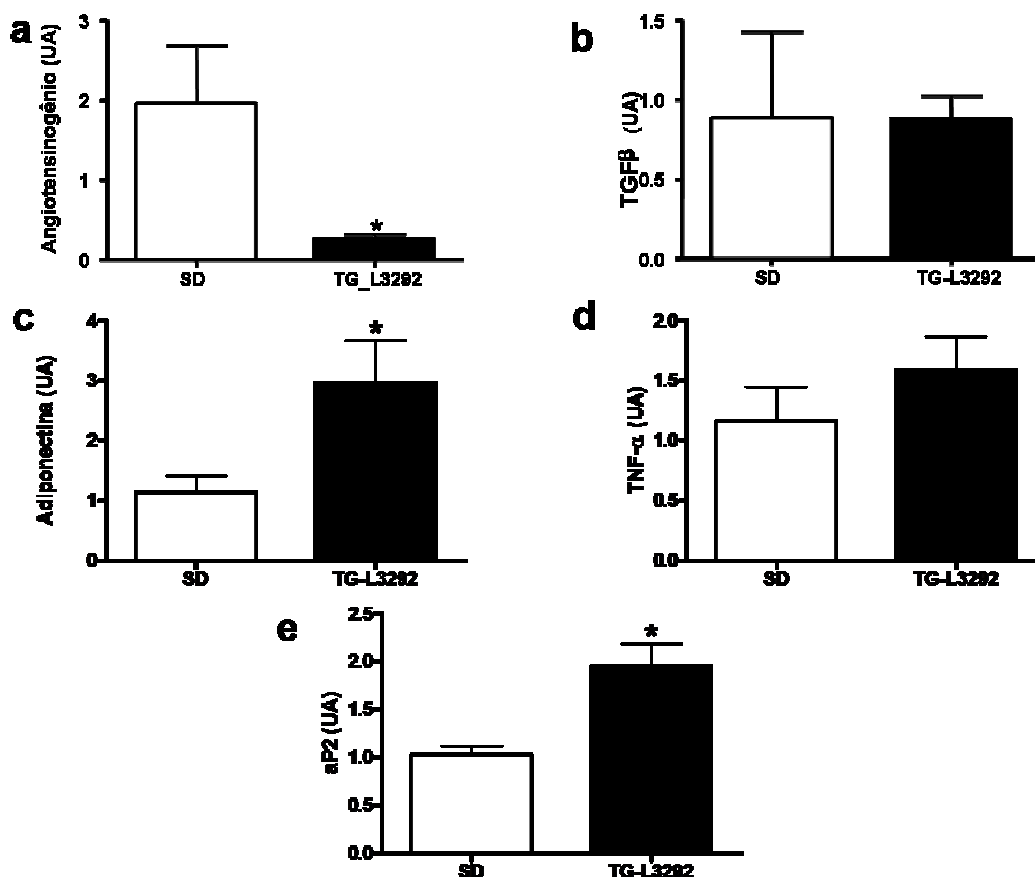
Os valores encontrados na dosagem dos níveis circulantes de adiponectina nos ratos da linhagem TGR-L3292 foram maiores do que os observados no grupo de animais SD ( $13760 \pm 234.4$  ng/ml vs  $11600 \pm 747.8$  ng/ml nos ratos SD) como representado na figura 10C. Observada a menor massa adiposa dos animais TGR-L3292, a correção mostrou uma produção por adipócito acentuadamente maior quando comparada a dos ratos SD ( $8393 \pm 420.0$  ng/ml vs  $3864 \pm 262.0$  ng/ml nos ratos SD) como mostrado na figura 10D.



**Figura 10** – Níveis plasmáticos de leptina e adiponectina nos ratos TGR-L3292 (n=7) e SD (n=7). (A) Nível plasmático de leptina (B) Razão entre os níveis circulantes de leptina e a massa de tecido adiposo por animal. (C) Nível plasmático de adiponectina (D) Razão entre os níveis circulantes de adiponectina e a massa de tecido adiposo por animal. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.1.8 Real Time PCR do tecido adiposo

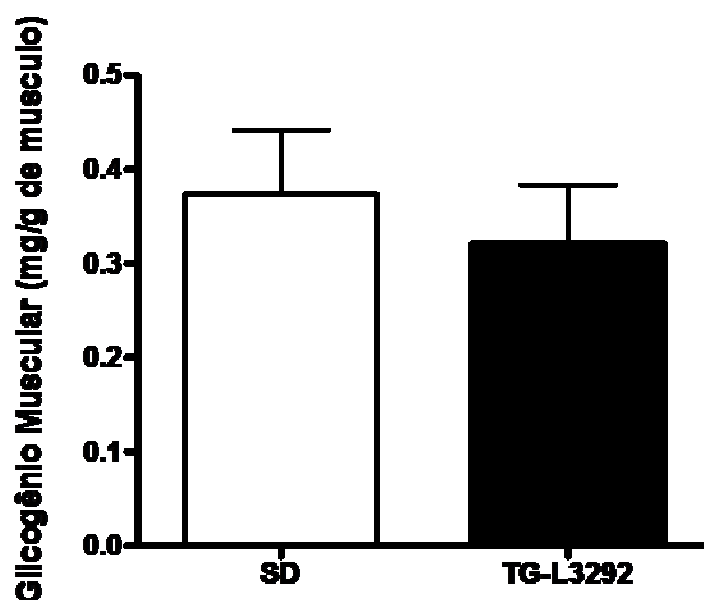
A análise da expressão do mRNA para angiotensinogênio (11A), TGF- $\beta$  (11B), adiponectina (11C), TNF- $\infty$  (11D) e aP2 (11E) avaliados por PCR em tempo real de amostras do tecido adiposo epididimal, mostrando uma diminuição significativa da expressão de angiotensinogênio ( $0.2683 \pm 0.05237$  UA vs  $1.955 \pm 0.7245$  UA nos ratos SD) sem alteração na expressão de TGF- $\beta$  e TNF- $\infty$ ; porém seguida de um importante aumento na expressão de adiponectina ( $2.954 \pm 0.7167$  UA vs  $1.140 \pm 0.2765$  UA nos ratos SD) e do gene aP2 ( $1.950 \pm 0.2371$  UA vs  $1.023 \pm 0.09429$  UA nos ratos SD).



**Figura 11** – Análise por PCR em tempo real do RNA extraído do tecido adiposo epididimal dos animais TGR-L3292 (n=7) e SD (n=7). (A) Expressão de angiotensinogênio (B) Expressão de TGF- $\beta$  (C) Expressão de adiponectina (D) Expressão de TNF- $\infty$  (E) Expressão do aP2. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.1.9 Glicogênio Muscular

A análise da dos níveis de glicogênio muscular mostrou que não existe diferença entre os grupos, indicando armazenamento enegético similar nos ratos avaliados.



**Figura 12** – Análise dos níveis de glicogênio no músculo esquelético dos ratos TGR-L3292 (n=7) e SD (n=7). Não foi observada diferença significativa entre os grupos.



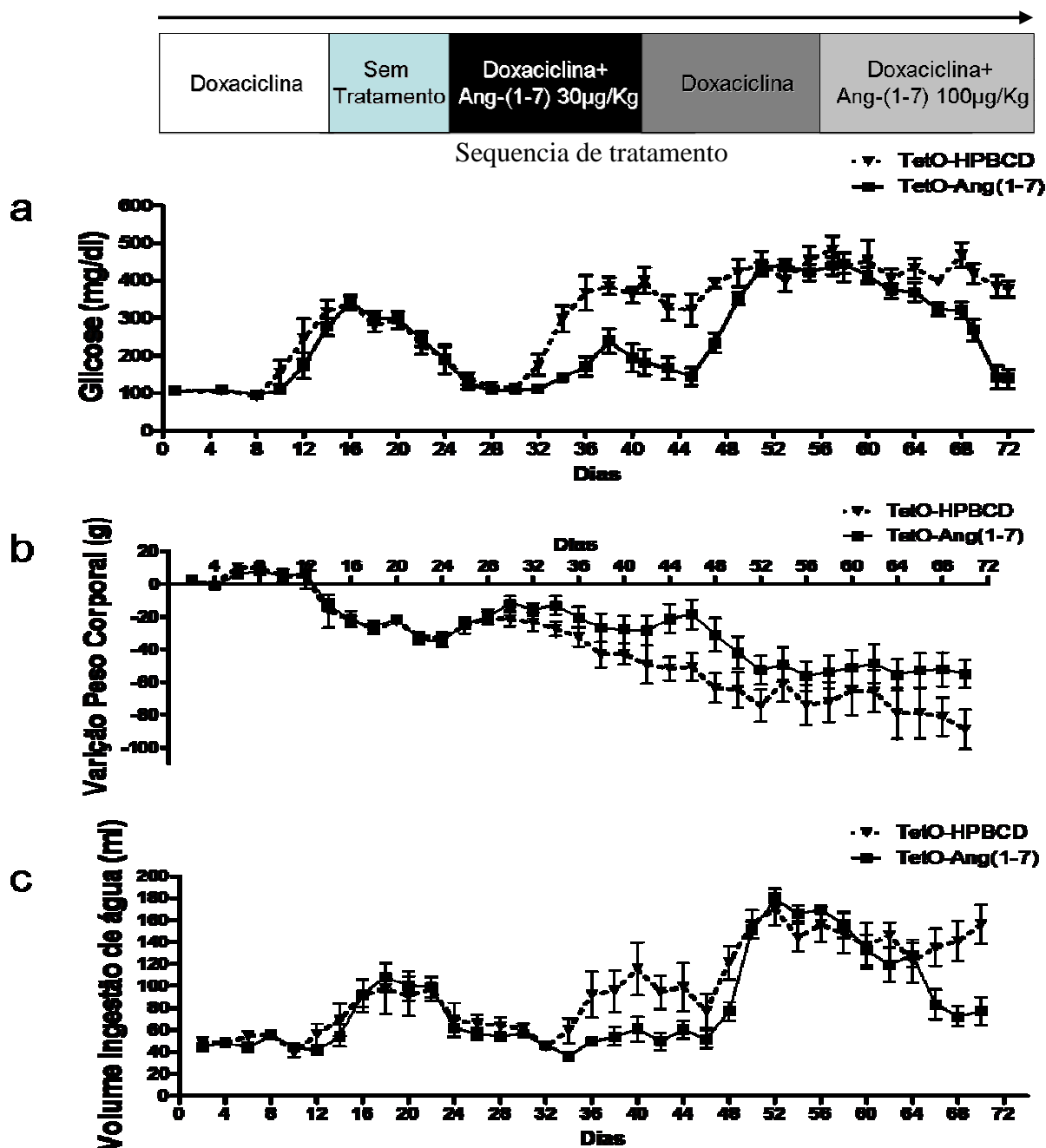
## 5.2 Ratos TetO-29

### 5.2.1 Glicemia, Peso corporal e Consumo de água

Todos os animais TetO-29 e SD foram tratados com doxaciclina do dia 1 até o dia 15 e o resultado mostrou que todos os ratos TetO-29 estavam aptos a responder ao tratamento, uma vez que se tornaram diabéticos (Figura 12 A). A subsequente interrupção do tratamento comprovou que o estado diabético gerado pela inibição da produção do receptor para insulina foi reversível, uma vez que os níveis glicêmicos se normalizaram por volta do 27º dia (Figura 12 A). A partir do 28º dia, a reinstituição do tratamento com doxaciclina, associado à gavagem com composto de inclusão (CI) no grupo TetO-Ang(1-7) e apenas com veículo no grupo TetO-HPBCD, mostrou que a angiotensina-1-7 na dosagem de 30 microgramas por kg de peso corporal administrada por via oral é capaz de prevenir o aumento dos níveis circulantes de glicose mantendo os valores em aproximadamente metade do observado no grupo controle. Com o intuito de normalizar os níveis glicêmicos entre os grupos, o tratamento com Ang-(1-7) foi suspenso no 45º dia por um total de 12 dias. Em seguida, o CI voltou a ser administrado na nova dose de 100 microgramas por kg de peso corporal e o resultado observado foi a reversão do quadro de hiperglicemia com acentuada redução dos valores de glicose circulante. Essa redução foi equivalente a metade dos valores hiperglicêmicos observados no grupo TetO-HPBCD (Figura 12 A).

A análise diária do peso corporal mostrou que durante os dias de tratamento com Ang-(1-7), em ambas as dosagens, a perda de peso corporal que acomete os ratos diabéticos foi atenuada e, em alguns dias, até mesmo revertida (Figura 12 B).

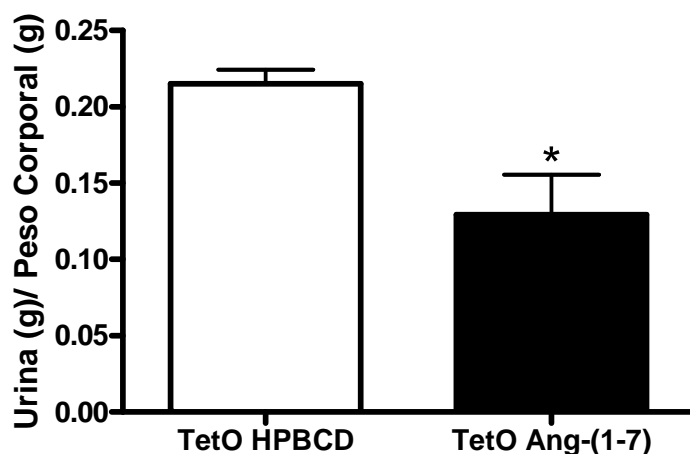
É característica do quadro de hiperglicemia o aumento da osmolaridade sérica que gera, por sua vez, um aumento do volume de ingestão de água. Como esperado, a análise do consumo de água acompanhou o mesmo perfil descrito para os níveis glicêmicos sendo bastante reduzida no grupo TetO-Ang- (1-7) durante os dias de tratamento com o CI. (Figura 12 C)



**Figura 13** – Glicemia, peso corporal e consumo de água dos animais TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO HPBCD (n=5). (A) Glicose plasmática (B) Peso corporal (C) Volume de ingestão de água. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student* ponto a ponto.

### 5.2.2 Diurese

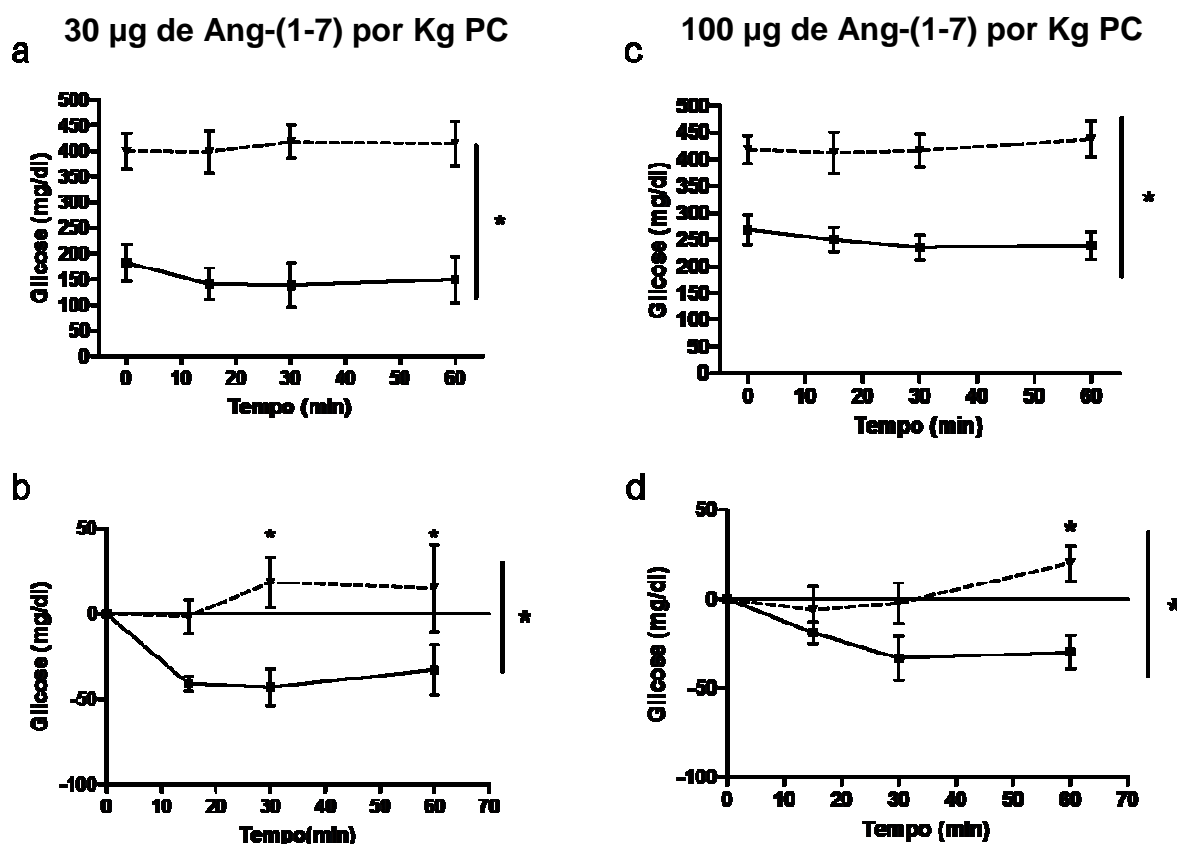
A diurese avaliada em gaiola metabólica ao fim do tratamento, durante a administração da dosagem de 100 microgramas de Ang-(1-7) por Kg peso corporal, mostrou que o grupo tratado com esse peptídeo apresenta uma menor massa urinária corrigida pelo peso corporal com valores que acompanham assim o perfil do volume de ingestão de água.



**Figura 14** – Diurese dos animais TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO-HPBCD (n=5). Massa urinária corrigida pelo peso corporal. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.2.3 Sensibilidade insulínica

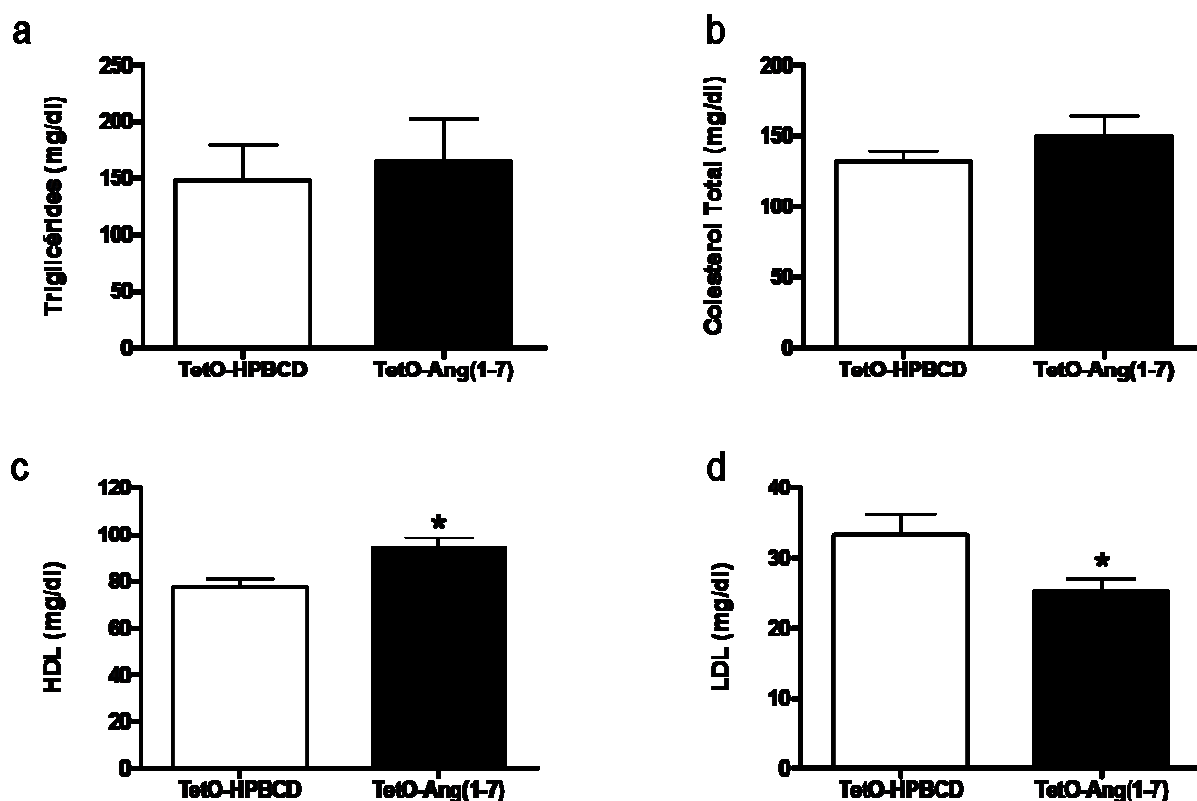
Os testes de sensibilidade insulínica realizados durante o tratamento com ambas as concentrações [30 e 100 microgramas de Ang-(1-7)], mostrou que os animais do grupo TetO-Ang-(1-7) possuem uma significativa recuperação da resposta à insulina que está abolida nos animais diabéticos tratados apenas com o veículo. Esse dado pode ser observado tanto nos gráficos com os valores de glicemia absolutos (Figuras 14 A e C), quanto nos gráficos com os valores de glicemia subtraído do valor inicial (ponto zero), como observado nas figura 14 B e D (Delta).



**Figura 15** – Sensibilidade insulínica TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO-HPBCD (n=5). (A) valores glicêmicos absolutos durante o tratamento com de 30 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (B) Delta da glicemia (valores – basal) durante o tratamento com de 30 µg de Ang-(1-7) por Kg PC (C) valores glicêmicos absolutos durante o tratamento com de 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (D) Delta da glicemia (valores – basal) durante o tratamento com de 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC . Os dados representam média ± EPM e foram analisados através do teste *two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.2.4 Perfil Lipídico

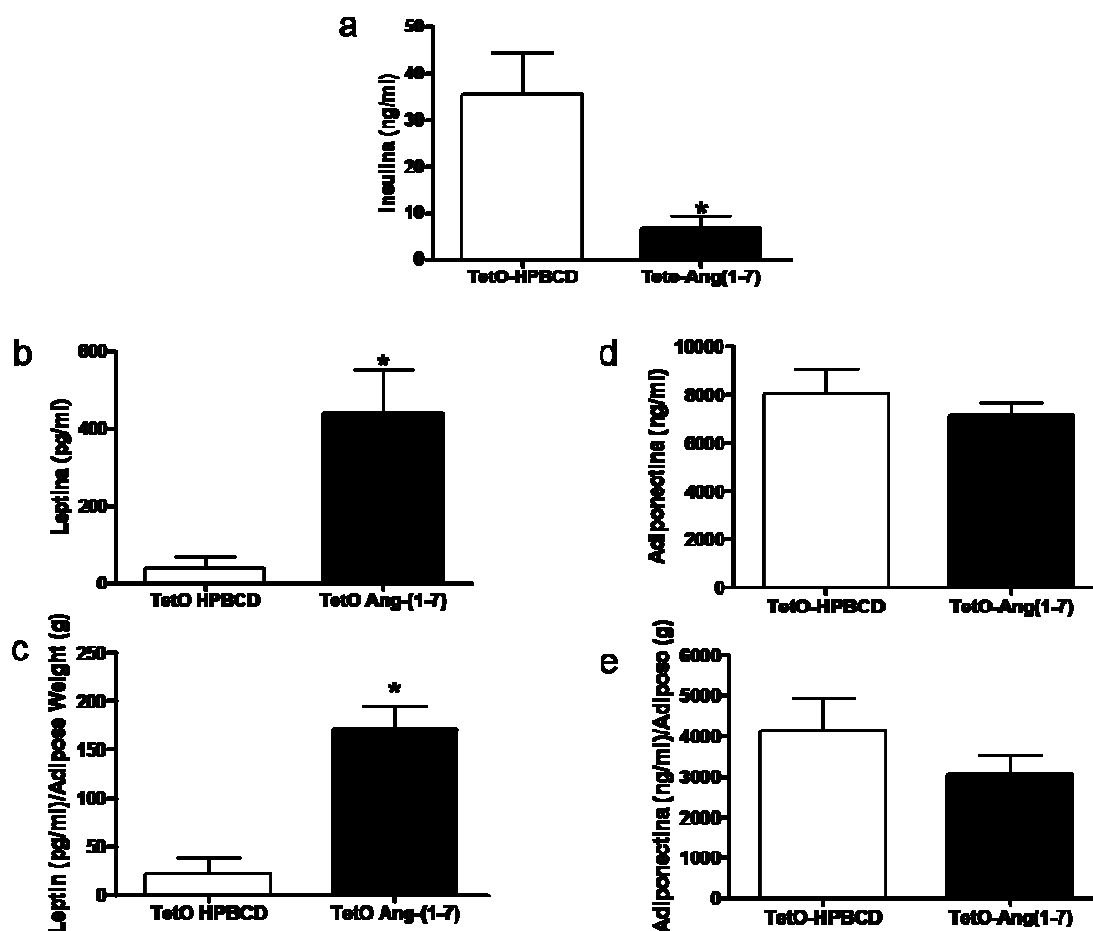
A análise do perfil lipídico ao término do tratamento [concentração de 100 microgramas de Ang-(1-7) por Kg PC] mostrou que os animais do grupo TetO-Ang-(1-7) apresentaram aumento na concentração plasmática de colesterol HDL ( $94.00 \pm 4.655$  mg/dl vs  $77.25 \pm 3.966$  nos ratos SD) (Figura 15 C) com redução na fração de colesterol LDL ( $25.20 \pm 1.881$  mg/dl vs  $33.33 \pm 2.848$  nos ratos SD) (Figura 15 D). A análise do colesterol total e triglicérides sérico mostraram não haver diferença entre os grupos (Figura 15 A e B).



**Figura 16** – Perfil lipídico dos grupos TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO-HPBCD (n=5) ao término do tratamento com 100  $\mu$ g de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) Valores séricos de triglicérides (B) valores séricos de colesterol total (C) valores séricos de colesterol HDL (D) valores séricos de colesterol LDL. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.2.5 Insulina e adipocinas

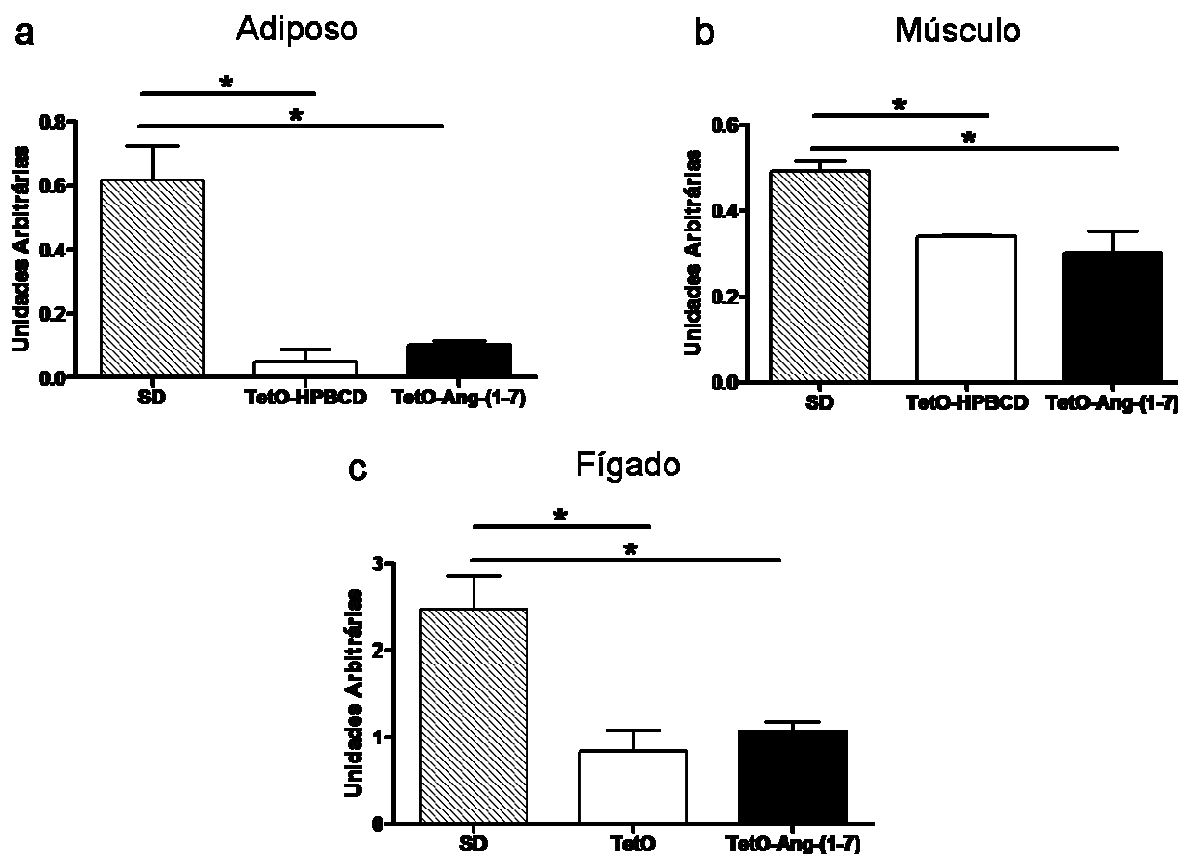
Ao término do tratamento com a concentração de 100 microgramas de Ang-(1-7) por Kg PC, os animais foram sacrificados e avaliou-se os valores séricos de algumas adipocinas e insulina. Os resultados mostraram que os animais do grupo TetO-Ang-(1-7) apresentaram uma reversão do quadro de hiperinsulinemia, característica do estado de diabético (Figura 16 A). Além disso, a análise dos níveis de leptina mostrou que o tratamento foi efetivo na restauração dos níveis circulantes desse hormônio (Figura 16 B) aumentando a produção relativa a massa adiposa (Figura 16 C). Os níveis circulantes (Figura 16 D) e a produção por massa adiposa (Figura 16 E) de adiponectina não diferiram entre os grupos TetO-Ang-(1-7) e TetO-HPBCD.



**Figura 17** – Níveis circulantes de adipocinas e insulina dos grupos TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO-HPBCD (n=5) ao término do tratamento com 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) Valores séricos de insulina (B) valores séricos de leptina (C) valores séricos de leptina corrigidos pela massa de tecido adiposo (D) valores séricos de adiponectina (E) valores séricos de adiponectina corrigidos pela massa de tecido adiposo. Os dados representam média ± EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo p<0.05.

### 5.2.6 Western blotting receptor de insulina

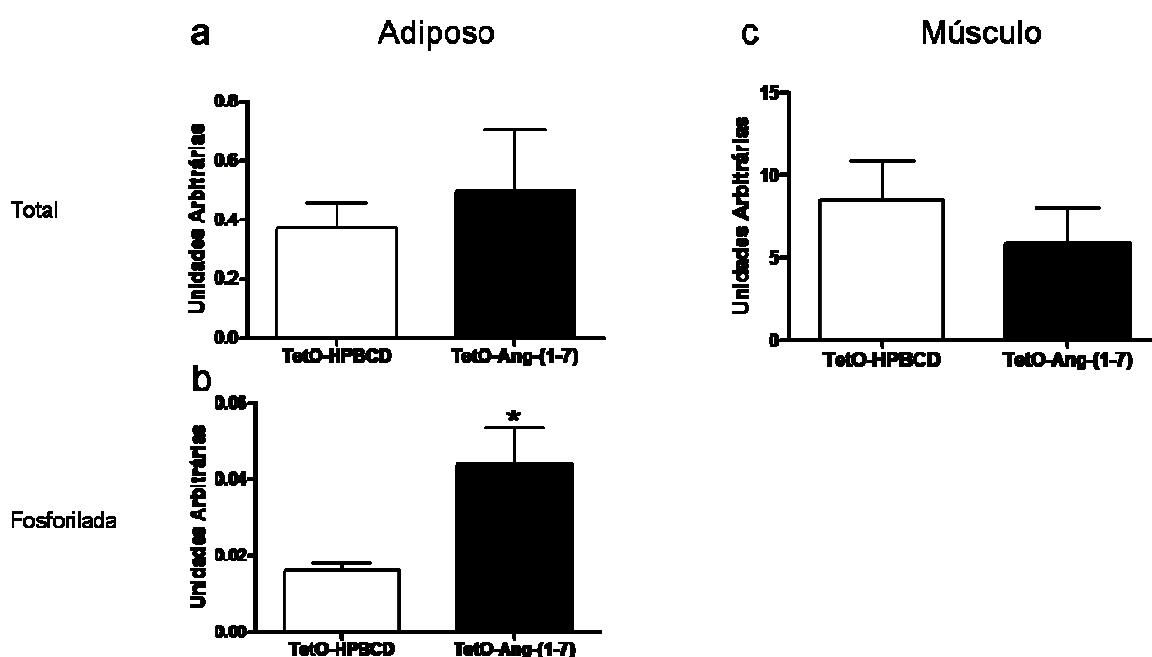
Após o sacrifício, ao término do tratamento com a concentração de 100 microgramas de Ang-(1-7) por Kg PC, realizou-se a extração protéica de amostras do tecido adiposo epididimal (Figura 17 A), músculo (Figura 17 B) e fígado (Figura 17 C) com o intuito de avaliar se as alterações fisiológicas encontradas se deviam a uma recuperação da expressão do receptor de insulina nos principais órgãos insulino-responsíveis com função de reserva energética. Observamos que tanto o grupo TetO-Ang-(1-7) quanto o TetO-HPBCD apresentaram uma significativa diminuição do receptor de insulina nos órgãos avaliados quando comparados com a expressão basal dos ratos controle SD, porém não existiu diferença entre os grupos TetO-Ang-(1-7) e o TetO-HPBCD.



**Figura 18** – Receptor de insulina dos grupos SD (n=3), TetO-Ang-1-7 (n=3) e TetO-HPBCD (n=3) ao término do tratamento com 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) Western blotting para o receptor de insulina no tecido adiposo (B) Western blotting para o receptor de insulina no músculo esquelético (C) Western blotting para o receptor de insulina no fígado. Os dados representam média ± EPM e foram analisados através do teste-T de Student. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.2.7 Western blotting para via da Akt total e fosforilada

A atividade da via de sinalização intracelular da Akt foi avaliada no tecido adiposo (Figuras 18 A e B) e no músculo (Figuras 18 C e D). Observamos que o grupo TetO-Ang-(1-7) apresentou uma maior quantidade de Akt fosforilada no tecido adiposo quando comparada ao grupo TetO-HPBCD (Figura 18 B). Porém não foi observada diferença significativa nos níveis de Akt total no tecido adiposo e no músculo (Figuras 18 A e C).

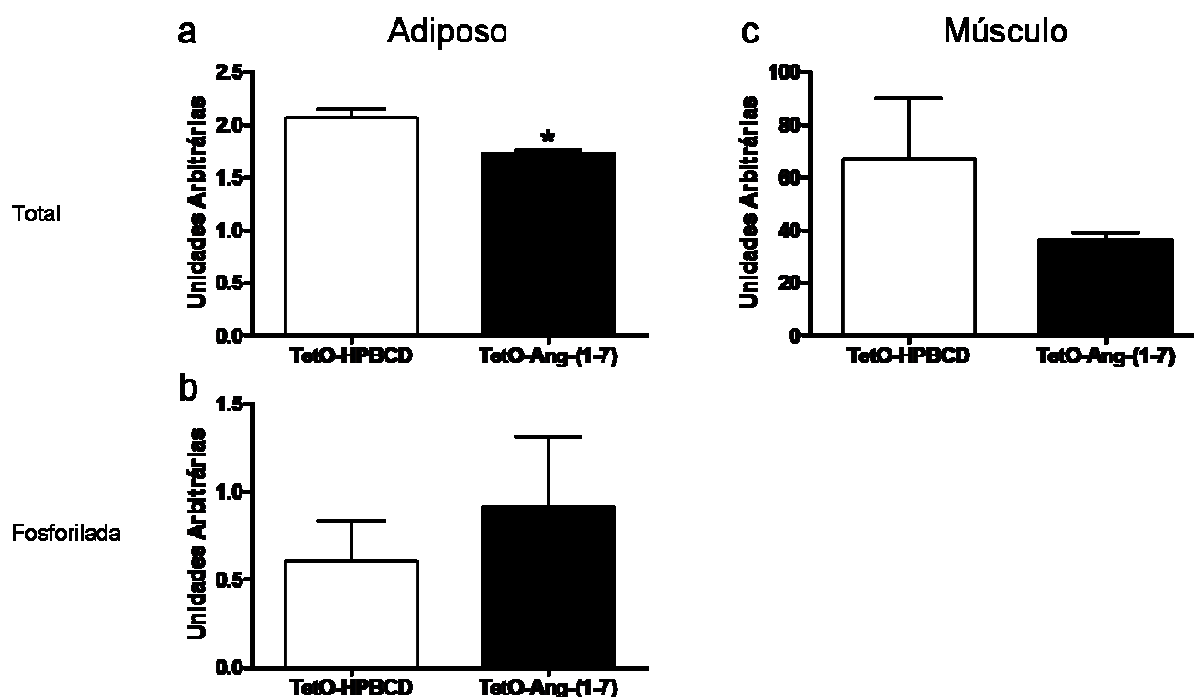


**Figura 19** – Akt total e fosforilada dos grupos TetO-Ang-1-7 (n=6) e TetO-HPBCD (n=6) ao término do tratamento com 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) Western blotting para Akt total no tecido adiposo (B) Western blotting para Akt fosforilada no tecido adiposo (C) Western blotting para o Akt total no músculo esquelético. Os dados representam média ± EPM e foram analisados através do teste-T de Student. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .



### 5.2.8 Western blotting para via da MAPK total e fosforilada

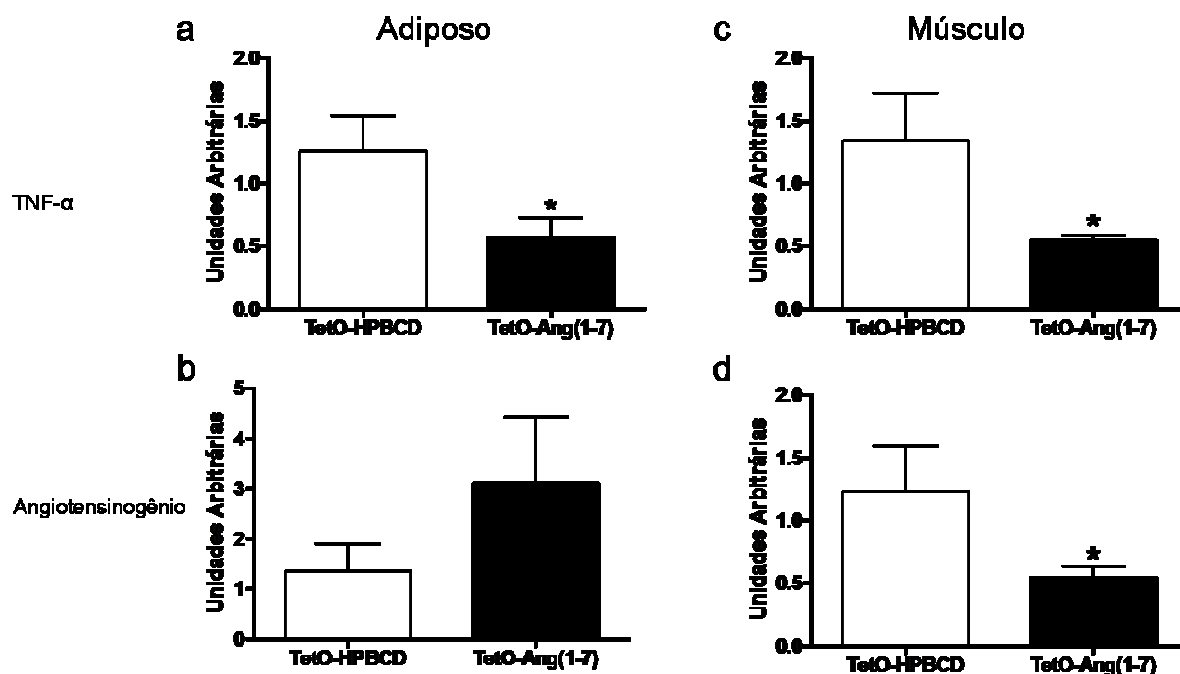
A atividade da via de sinalização intracelular da MAPK foi analisada pela avaliação dos níveis de Erk42/44 no tecido adiposo (Figuras 19 A e B) e no músculo (Figuras 19 C e D). Observamos que o grupo TetO-Ang-(1-7) apresentou uma menor quantidade de Erk 42/44 total no tecido adiposo quando comparada ao grupo TetO-HPBCD (Figura 19 A). Porém não foi observada diferença significativa nos níveis de Erk 42/44 total no músculo (Figura 19 C) e Erk 42/44 fosforilada no tecido adiposo (Figura 19 B).



**Figura 20** – Erk 42/44 (MAPK) total e fosforilada dos grupos TetO-Ang-1-7 (n=6) e TetO-HPBCD (n=6) ao término do tratamento com 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) Western blotting para Erk 42/44 total no tecido adiposo (B) Western blotting para Erk 42/44 fosforilada no tecido adiposo (C) Western blotting para Erk 42/44 total no músculo esquelético. Os dados representam média ± EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.2.9 Real time PCR para Angiotensinogênio e TNF- $\alpha$

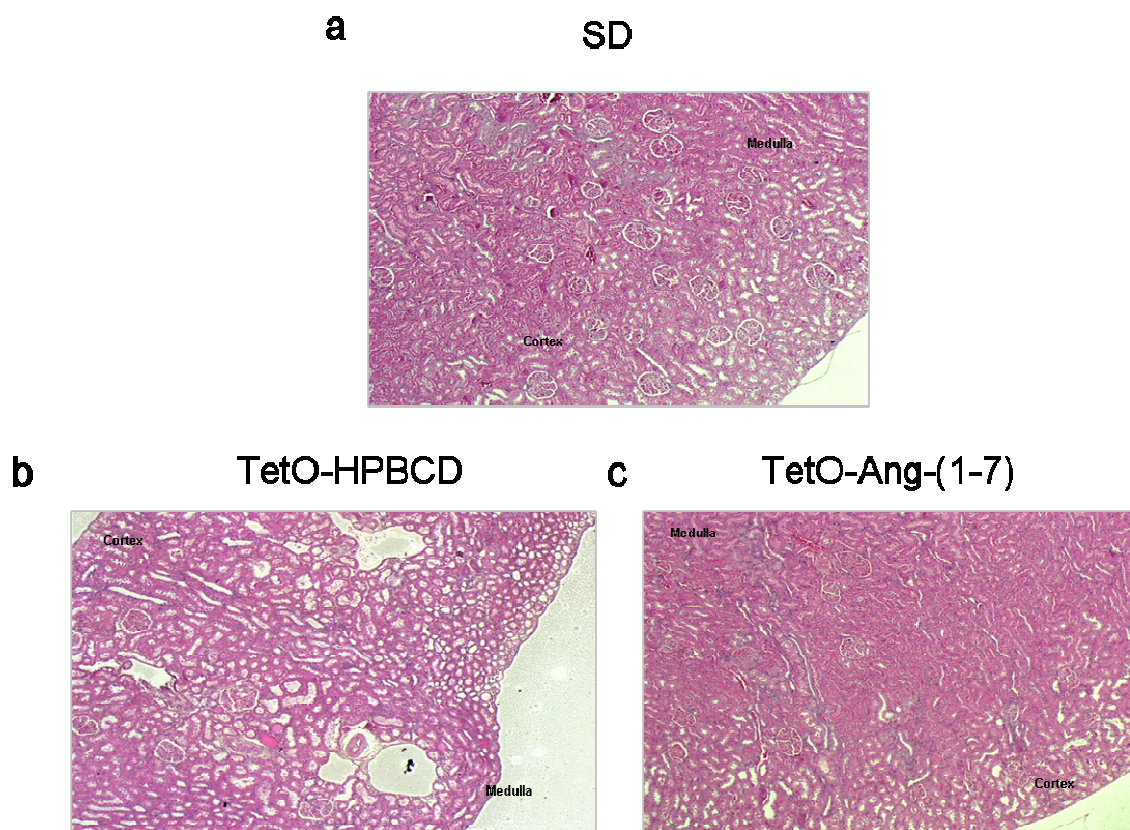
A expressão gênica da citosina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  e do angiotensinogênio foi avaliada no tecido adiposo e no músculo esquelético. Observamos que o grupo TetO-Ang-(1-7) apresentou uma menor expressão do TNF- $\alpha$  tanto no tecido adiposo quanto no músculo comparado ao grupo TetO-HPBCD (Figuras 20 A e C). A análise do angiotensinogênio mostrou uma diminuição significativa no músculo (Figura 20 D) dos animais tratados com Ang-(1-7) sem diferença significativa nos níveis expressos no tecido adiposo (Figura 20 B).



**Figura 21** – Real time PCR dos grupos TetO-Ang-1-7 (n=7) e TetO-HPBCD (n=7) ao término do tratamento com 100  $\mu$ g de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) Expressão do RNAm do TNF- $\alpha$  no tecido adiposo (B) Expressão do RNAm do angiotensinogênio no tecido adiposo (C) Expressão do RNAm do TNF- $\alpha$  no músculo esquelético (D) Expressão do RNAm do angiotensinogênio no músculo esquelético. Os dados representam média  $\pm$  EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .

### 5.2.10 Histologia renal – coloração hematoxilina-eosina

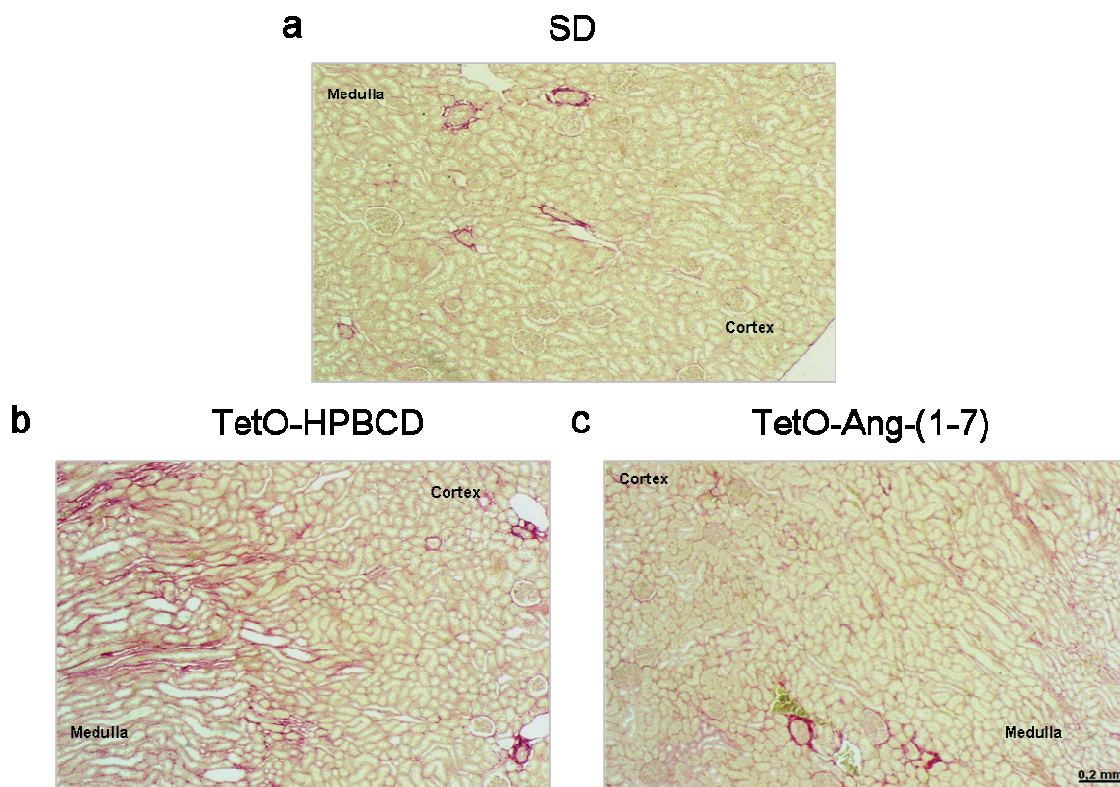
A análise histológica renal mostrou que o animais do grupo TetO-Ang-(1-7) possuem uma visível redução da lesão renal uma vez que se pode observar menor dilatação glomerular e dos vasos.



**Figura 22** – Análise histológica renal pela técnica de hematoxilina-eosina dos animais SD (n=5) TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO-HPBCD (n=5) ao término do tratamento com 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) imagem ilustrativa animais controle SD (B) imagem ilustrativa animais controle TetO-HPBCD (C) imagem ilustrativa animais controle TetO-Ang-(1-7).

### 5.2.11 Histologia renal – coloração sirius red

A análise histológica renal mostrou que o animais do grupo TetO-Ang-(1-7) possuem uma visível redução da lesão renal uma vez que pode-se observar menor deposição de colágeno após coloração histológica com sírius red.



**Figura 23** – Análise histológica renal pela técnica de sirius red dos animais SD (n=5) TetO-Ang-1-7 (n=5) e TetO-HPBCD (n=5) ao termino do tratamento com 100 µg de Ang-(1-7) por Kg PC. (A) imagem ilustrativa animais controle SD (B) imagem ilustrativa animais controle TetO-HPBCD (C) imagem ilustrativa animais controle TetO-Ang-(1-7).

***DISCUSSÃO***

---

## 6- Discussão

Há muitas décadas diversos estudos têm demonstrado a importância do SRA na homeostasia e regulação do sistema cardiovascular. As aplicações clínicas dos conhecimentos obtidos são evidentes quando avaliamos os benefícios do uso dos antagonistas do receptor  $AT_1$  de angiotensina II e dos inibidores de ECA para o tratamento da hipertensão arterial (Khosla and Black 2006; Mehta and Griendling 2007). Os estudos clínicos com os inibidores de ECA mostraram que, além dos benefícios para o sistema cardiovascular, essas drogas geram uma melhora no metabolismo do tecido adiposo e redução do peso corporal, o que levou à importantes investigações sobre o papel da Ang II na regulação lipídica e glicêmica. No entanto, o papel do eixo Ang-(1-7)/Mas, caracterizado como importante contra-regulador do eixo Ang II/ $AT_1$  (Santos, Campagnole-Santos et al. 2000), havia sido pouco estudado. O presente estudo buscou avaliar a importância da Ang-(1-7) e seu receptor específico, Mas, no metabolismo glicêmico e lipídico em ratos normais e diabéticos.

A primeira etapa deste trabalho consistiu na avaliação metabólica de camundongos da linhagem FVB/N knockouts para o receptor Mas. Os resultados mostraram que a ausência do receptor da Ang-(1-7) induziu um estado de desordem metabólica semelhante ao quadro da síndrome plurimetabólica humana, com aumento da massa adiposa, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia, dentre outros achados (Santos, Fernandes et al. 2008). Neste contexto, os objetivos seguintes foram avaliar se o aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7) seriam capazes de alterar o metabolismo glicêmico e lipídico de ratos, tanto no estado basal (sem a presença de doenças) quanto em animais com alguma alteração que envolvesse desregulação metabólica.

O modelo escolhido para avaliar o papel do aumento crônico da Ang-(1-7) foi o rato transgênico da linhagem TGR-L3292 que possui a inserção genética de um “construct” composto por um promotor inespecífico e a seqüência do peptídeo Ang-(1-7) (Santos, Ferreira et al. 2004), o que faz com que esse heptapeptídeo seja expresso e produzido de forma independente da cascata enzimática do SRA. A caracterização inicial da expressão gênica deste “construct” mostrou que sua expressão foi direcionada, principalmente, para o testículo, induzindo um aumento de 2,5 vezes na concentração de Ang-(1-7) na circulação, sendo esse órgão então caracterizado como uma bomba de infusão biológica (Santos, Ferreira et al. 2004). Esse modelo foi utilizado em diversos estudos prévios mostrando que o aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) gera efeito cardioprotetor, atenuando a hipertrofia cardíaca e a arritmia de reperfusão, diminuindo a deposição de proteínas da matriz extracelular e reduzindo a resistência periférica total e, ainda, melhorando a função renal (Santos, Ferreira et al. 2004; Ferreira, Pinheiro et al. 2006; Botelho-Santos, Sampaio et al. 2007; Nadu 2008).

O modelo patológico escolhido para avaliação do papel da Ang-(1-7) na prevenção e reversão de alterações metabólicas foi o diabetes melito do tipo 2, uma vez que o diabetes e a resistência à insulina, uma doença com alta prevalência mundial, estão associados principalmente à obesidade, dislipidemia e doenças cardiovasculares (Dandona, Aljada et al. 2005; Goebel and Schulz 2006). Com esse intuito escolhemos um novo modelo de rato transgênico que desenvolve diabetes do tipo 2. Esse animal foi produzido pela inserção de um “construct” dotado de um promotor inespecífico, um sítio sensível a tetraciclina e uma seqüência de shRNA que induz o bloqueio da produção do receptor de insulina (Kotnik, Popova et al. 2009). Assim, esse modelo torna possível a

realização de manobras, como a indução do quadro de resistência à insulina e diabetes (através da inibição da expressão do receptor de insulina) pela administração de antibióticos da classe das tetraciclina, e ao mesmo tempo permite a reversão do quadro (quando necessário) através da interrupção do tratamento (Kotnik, Popova et al. 2009). Esses animais foram tratados com Ang-(1-7) incluída em Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD), formulação desenvolvida e patenteada pelo departamento de química da UFMG em parceria com o laboratório de hipertensão onde o presente trabalho foi desenvolvido (Lula, Denadai et al. 2007). A escolha se baseou na aplicabilidade clínica da formulação, uma vez que essa pode ser administrada por via oral e comprovadamente aumenta os níveis circulantes de Ang-(1-7).

Até o momento os estudos sobre o envolvimento do SRA no metabolismo têm sido centrados nas ações da Ang II e insulina. Atualmente é bastante claro que a Ang II tem um importante efeito no metabolismo glicêmico e nas ações da insulina, aumentando a ativação da via proliferativa (MAPK) e diminuindo a ativação da via metabólica PI3K/Akt (Folli, Kahn et al. 1997; Boustany, Bharadwaj et al. 2004; Giacchetti, Sechi et al. 2005; Carvalho-Filho, Carvalheira et al. 2007). O efeito da Ang II na via metabólica (PI3K/Akt) é mediado pelo aumento da fosforilação em serina do receptor de insulina, do IRS-1 e da P-85, além da indução de menor fosforilação em tirosina do IRS-1 (Folli, Kahn et al. 1997). A Ang II também inibe a estimulação da comunicação entre o IRS-1 e a via da PI3K, diminuindo assim a atividade intrínseca da PI3K associada com o complexo P85/P110 (Folli, Kahn et al. 1997). Esses mecanismos alterados estão correlacionados com o aumento dos níveis de AGT e Ang II no quadro de resistência à insulina. Em indivíduos saudáveis, a perfusão subcutânea no tecido adiposo com Ang II por microdiálise leva a inibição da captação de glicose



(Boschmann, Ringel et al. 2001). Recentemente foi descrito que o tratamento com Ang-(1-7) através de mini-bombas osmóticas em ratos tratados com dieta rica em frutose pode melhorar a sensibilidade insulínica e o aumento da pressão; neste modelo a Ang-(1-7) foi capaz de normalizar a diminuição da sinalização da via composta pelo receptor de insulina/IRS-1/PI3K/Akt, aumentando assim a ativação da via metabólica (Giani, Mayer et al. 2009).

Esses novos achados estão em acordo com as observações obtidas em nosso estudo que mostraram que os camundongos Mas-Knockout apresentam uma piora do metabolismo glicêmico (Santos, Fernandes et al. 2008). Além disso nossos resultados mostraram que os ratos TGR-L3292 possuem maior sensibilidade à insulina, aumento da tolerância à glicose e maior resposta ao estímulo insulínico no teste de captação à glicose pelo tecido adiposo. No entanto, os resultados mais contundentes foram encontrados nos animais TetO-Ang-(1-7), que apresentaram uma reversão do quadro de diabetes com melhora de todos os parâmetros glicêmicos avaliados com diminuição das lesões e alterações induzidas por essa doença. Em conjunto, esses resultados corroboram com a hipótese de que a Ang-(1-7) melhora a sinalização da via metabólica insulínica e diminui a ativação da via proliferativa. Os resultados obtidos por Western blotting complementam esses dados mostrando que tanto nos ratos transgênicos TGR-L3292 quanto nos TetO-Ang-(1-7) ocorre um aumento da ativação da via da PI3K/Akt acompanhado de uma diminuição da via da MAPK nos animais TetO tratados com Ang-(1-7) por via oral. A ausência de alteração nos valores da glicemia basal e no glicogênio muscular dos ratos TGR-L3292 indica que o eixo Ang-(1-7)/Mas pode ter uma função proeminente na regulação do metabolismo glicídico principalmente mediante alterações na

homeostasia glicêmica como acontece no estímulo insulínico e na aplicação de glicose.

Nos últimos anos o tecido adiposo tem sido descrito como um importante órgão endócrino capaz de liberar diferentes adipocinas que apresentam relevantes ações na regulação do metabolismo lipídico e glicêmico e podem atuar como moduladoras da ingestão alimentar (Trayhurn and Beattie 2001; Guerre-Millo 2004). A adiponectina é uma das mais importantes adipocinas e foi reconhecida como uma reguladora chave da sensibilidade insulínica e do processo inflamatório tissular. Essa adipocina apresenta importantes ações no fígado, músculo esquelético e na vasculatura, com um papel proeminente na sensibilidade insulínica hepática, no aumento da oxidação energética dos combustíveis e diminuindo a inflamação vascular (Guerre-Millo 2004; Havel 2004). Diferentemente das outras adipocinas, os níveis circulantes e a secreção de adiponectina são inversamente proporcional ao conteúdo de massa gorda corporal. Os valores circulantes estão importantemente reduzidos em indivíduos com diabetes, obesos e com doenças arteriais coronarianas (Havel 2004; Rothenbacher, Brenner et al. 2005). A adiponectina antagoniza vários efeitos do TNF- $\alpha$  e este, por sua vez, suprime a produção de adiponectina (Whitehead, Richards et al. 2006). Nesse estudo foi observado um aumento importante nos níveis circulantes de adiponectina no rato TGR-L3292 e também na produção por adipócito (níveis circulantes corrigidos pela massa de tecido adiposo), que foi confirmada pelo aumento da expressão do mRNA para adiponectina no tecido adiposo. Esse resultado pode explicar, pelo menos parcialmente, o aumento da sensibilidade insulínica e tolerância a glicose observadas neste modelo, indicando a participação da Ang-(1-7) na regulação da secreção e produção de adipocinas. Em acordo com esses dados, foi observado também que os animais

Mas-knockout apresentam uma diminuição na secreção de adiponectina (Santos, Fernandes et al. 2008). Estudos futuros envolvendo cultura primária de adipócitos, obtidas de animais com alterações no eixo Ang-(1-7)/Mas podem vir a ser peças fundamentais para análise dos mecanismos envolvidos nessa possível regulação da secreção de adipocinas.

É bem claro na literatura que a produção hormonal do tecido adiposo está bastante alterada em indivíduos obesos, ocorrendo aumento da produção de leptina e diminuição dos níveis de adiponectina (Weyer, Funahashi et al. 2001). Uma vez que pacientes em uso de inibidores da ECA possuem níveis de adiponectina restabelecidos, acredita-se que o aumento nos níveis de Ang II seja um fator importante na inibição da síntese dessa adipocina, assim como ela é fundamental na maturação de pré-adipócitos (Furuhashi, Ura et al. 2003). Dessa forma, a ausência do receptor Mas pode ser responsável também pela menor síntese de adiponectina nos animais KO-Mas, por potencializar o efeito da Ang II devido à ausência da ação contraregulatória da Ang-(1-7), ou mesmo pela ausência de uma via direta que possa desencadear uma cascata de sinalização pela ativação do receptor Mas.

Vários componentes do SRA, incluindo o receptor Mas, são produzidos localmente pelo tecido adiposo (Rankinen, Gagnon et al. 1999; Giacchetti, Faloia et al. 2002). Nesse tecido e no fígado de ratos SD a glicose possui efeito estimulante e a insulina efeito inibidor para a expressão de AGT (Gabriely, Yang et al. 2001). Também foi demonstrado que em ratos obesos o efeito de estímulos nutricionais está aumentado devido ao quadro de resistência à insulina que por sua vez gera supressão de seu efeito (Jones, Standridge et al. 1997). De acordo, camundongos KO-Mas apresentam resistência à insulina e intolerância à glicose com aumento da glicemia de jejum . Um estudo com ratos

obesos Zucker mostrou um aumento na expressão e secreção do AGT pelos adipócitos (Hainault, Nebout et al. 2002). Sabe-se que o aumento dos níveis de AGT é um importante modulador da diferenciação dos pré-adipócitos, especialmente porque a Ang II tem um papel fundamental neste processo. Em nosso estudo, também foi observado que a deficiência do receptor Mas em camundongos leva a um aumento significativo da expressão do AGT no tecido adiposo (Santos, Fernandes et al. 2008), sugerindo que o eixo Ang-(1-7)/Mas participe dessa regulação. Corroborando essa hipótese foi observado uma grande redução da expressão do AGT no tecido adiposo dos ratos TGR-L3292 e no músculo dos animais do grupo TetO-Ang-(1-7).

Acredita-se que a Ang II exerça efeito na adiposidade pela regulação da síntese e armazenamento de lipídeos, aumentando o conteúdo de triglicérides e alterando a atividade de enzimas lipogênicas (sintase de ácidos graxos e glicerol-3-fosfato desidrogenase) (Strazzullo and Galletti 2004). Assim, a Ang II pode estimular a maturação adipocitária, enquanto, paralelamente, aumenta a degradação lipídica. Considerando os resultados obtidos neste estudo, observamos que apesar de possuir um consumo de comida igual ao do grupo controle, os animais TGR-L3292 apresentam uma importante diminuição da massa de tecido adiposo abdominal, sem evidência de atrofia dos adipócitos, uma vez que a análise histológica mostrou não haver alteração no diâmetro dos mesmos. Essa diminuição da massa adiposa pode explicar, pelo menos parcialmente, a diminuição do peso corporal apresentada por esses animais. A ausência de alterações na ingestão alimentar indica que as mudanças no peso de massa gorda não foram induzidas por apetite diminuído e sim por alterações na regulação metabólica e despêndio energético. Esses resultados estão em acordo com os estudos de Jayasooriya e colaboradores (Jayasooriya, Mathai et

al. 2008) que demonstraram que a deleção do gene da ECA em camundongos leva a um aumento do gasto energético com redução da massa gorda associado a um aumento dos níveis de Ang-(1-7) circulantes. No mesmo sentido, foi observado que os camundongos KO-Mas possuem aumento da massa da adiposa, evidenciando o papel deste receptor na regulação do balanço energético (Santos, Fernandes et al. 2008). Em síntese, todas as evidências apresentadas indicam que o SRA possui um papel importante no controle da massa do tecido adiposo. É válido ressaltar que os animais TetO-29 não são um bom modelo para a análise da massa do tecido adiposo, uma vez que o quadro severo de diabetes observado induziu grande perda dos estoques energéticos praticamente eliminando este órgão e alterando as características fenotípicas e fisiológicas do mesmo.

A leptina é uma importante adipocina correlacionada com o controle da saciedade, ingestão alimentar, peso corporal e massa adiposa (Caro, Sinha et al. 1996). Apesar dos animais TGR-L3292 apresentarem diminuição da massa adiposa, os níveis de leptina circulante foram iguais aos do grupo controle SD, mostrando que a produção por adipócito está aumentada, provavelmente para manter assim os níveis circulantes normais. Esse fato pode explicar a ausência de alteração no consumo de comida observado nesses animais.

As associações entre inflamação, diabetes melito do tipo 2 e obesidade já vêm de longa data, porém estudos recentes ampliaram esse conhecimento e foram encontrados vários marcadores de processos inflamatórios associados com a resistência à insulina (Dandona, Aljada et al. 2005; Cassis, Police et al. 2008). Estudos recentes mostram que o tecido adiposo produz várias citocinas, como o TNF- $\alpha$ , que pode estar relacionado a resistência à insulina em modelos experimentais e têm papel fundamental na patogênese dessa doença (Shoelson,

Lee et al. 2006). Sabe-se que a ausência do TNF- $\alpha$  ou de seus receptores resulta em melhora significativa da sensibilidade à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta, hipotalâmica ou genética (Uysal, Wiesbrock et al. 1997; Ventre, Doebber et al. 1997). Os dados obtidos com os animais TetO-29 tratados com Ang-(1-7) mostraram uma importante diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo e muscular sugerindo que Ang-(1-7) pode alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias.

O papel do SRA no metabolismo lipídico tem sido bastante estudado, mas muitos aspectos continuam controversos. Nos dias atuais é bastante claro que os bloqueadores do eixo AngII/AT<sub>1</sub> (iECA e ARBs) podem prevenir a aterosclerose e diminuir os níveis circulantes de triglicérides e colesterol (Prasad and Quyyumi 2004; Strazzullo and Galletti 2004; Giacchetti, Sechi et al. 2005; Kyvelou, Vyssoulis et al. 2006; Santos, de Picoli Souza et al. 2008); (Katsuya, Horiuchi et al. 1995; Jones, Standridge et al. 1997; Strazzullo and Galletti 2004; Cassis, Police et al. 2008). Os animais TGR-L3292 apresentaram uma grande diminuição nos níveis circulantes de triglicérides e colesterol total, indicando que a Ang-(1-7) pode regular os níveis lipídicos circulantes. Este resultado pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao grande aumento nos níveis circulantes de adiponectina, uma vez que essa adipocina possui um papel chave na regulação lipídica (Altinova, Toruner et al. 2007; Rodriguez, Catalan et al. 2007). Outra forte evidência de que a Ang-(1-7) age na regulação do metabolismo lipídico é o aumento dos níveis circulantes de colesterol HDL e diminuição do LDL no grupo TetO-Ang-(1-7). Esses dados estão de acordo com o aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol total observados nos camundongos Ko-Mas (Santos, Fernandes et al. 2008).

Outra importante proteína envolvida no metabolismo do tecido adiposo é a aP2 também chamada de ALBP (lipid-binding protein), que pertence a família das proteínas citosólicas relacionadas a captação de cadeias longas de ácidos graxos (Ockner 1990; Melki and Abumrad 1993; Gregoire, Smas et al. 1998). Já foi previamente demonstrado que, em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, os níveis dessa proteína estão fortemente diminuídos (Melki and Abumrad 1993). Nos animais TGR-L3292 foi observado um importante aumento da expressão do mRNA da aP2 no tecido adiposo. Esse dado associado à diminuição da massa de tecido adiposo e diminuição dos triglicérides e colesterol plasmáticos no TGR-L3292 indicam um metabolismo lipídico melhorado nos adipócitos desses animais.

A análise do perfil fisiológico e metabólico do grupo TetO-Ang-(1-7) mostra uma melhora geral dos parâmetros avaliados, com diminuição da diurese, melhora do perfil lipídico, reestabelecimento dos níveis circulantes de leptina e uma importante diminuição da lesão renal evidenciada pelas análises histológicas; parâmetros esses que se encontram comumente prejudicados em indivíduos com altos níveis de glicose circulante ou em modelos experimentais de diabetes. Podemos concluir assim que o tratamento com Angiotensina-(1-7), por via oral, previniu ou reverteu essas alterações principalmente por impedir a instalação da hiperglicemia e por ter melhorado a sensibilidade insulínica.

**CONCLUSÃO**



## 7- Conclusão

Em síntese, nossos resultados mostraram que o aumento crônico dos níveis circulantes de Ang-(1-7), tanto por administração oral quanto no rato transgênico com superexpressão de Ang-(1-7), pode melhorar o metabolismo lipídico e glicêmico e regular a massa adiposa, corroborando os dados observados nos animais Ko-Mas. Os mecanismos envolvidos nesse processo parecem estar relacionados com a regulação da produção de adipocinas, aumento da atividade da via da Akt e diminuição da via da MAPK. Além disso, os resultados evidenciam que o aumento crônico desse peptídeo na circulação não induz sinais de taquifilaxia com perda dos efeitos metabólicos.

Considerando que resultados comparáveis foram obtidos em espécies e modelos metodológicos diferentes, utilizando camundongos Ko-Mas, ratos TGR-L3292 com superexpressão de Ang-(1-7) e ratos diabéticos TetO-29 tratados com Ang-(1-7), conclui-se que o papel da Ang-(1-7), atuando via receptor Mas, exerce grande influência no metabolismo lipídico e glicêmico de roedores.

Esses achados têm também uma grande relevância clínica, uma vez que a Ang-(1-7) é um componente natural da circulação humana. Dessa forma, a ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas aparece como uma promissora manobra terapêutica para tratamento de doenças relacionadas com a desregulação metabólica, principalmente pelo fato de que a administração oral induziu a prevenção e reversão do quadro de diabetes.

## ***REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA***

---

## 8- Referencia Bibliográfica

- Aitman, T. J., J. K. Critser, et al. (2008). "Progress and prospects in rat genetics: a community view." Nat Genet **40**(5): 516-522.
- Alenina, N., M. Bader, et al. (2002). "Imprinting of the murine MAS protooncogene is restricted to its antisense RNA." Biochem Biophys Res Commun **290**(3): 1072-1078.
- Altinova, A. E., F. Toruner, et al. (2007). "Decreased plasma adiponectin is associated with insulin resistance and HDL cholesterol in overweight subjects." Endocr J **54**(2): 221-226.
- Ambroz, C., A. J. Clark, et al. (1991). "The mas oncogene enhances angiotensin-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors." Biochim Biophys Acta **1133**(1): 107-111.
- Aspichueta, P., B. Perez-Agote, et al. (2006). "Impaired response of VLDL lipid and apoB secretion to endotoxin in the fasted rat liver." J Endotoxin Res **12**(3): 181-192.
- Batenburg, W. W., I. M. Garrelds, et al. (2004). "Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries." Circulation **109**(19): 2296-2301.
- Bayorh, M. A., D. Eatman, et al. (2002). "1A-779 attenuates angiotensin-(1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats." Peptides **23**(1): 57-64.
- Blaj, S., S. Stanciu, et al. (2003). "Hypertension in obese patients: a dysmetabolic hypertension with a possible adipocyte dysfunction mechanism." Rom J Intern Med **41**(2): 103-111.
- Boschmann, M., J. Ringel, et al. (2001). "Metabolic and hemodynamic response of adipose tissue to angiotensin II." Obes Res **9**(8): 486-491.
- Botelho-Santos, G. A., W. O. Sampaio, et al. (2007). "Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2485-2490.
- Boustany, C. M., K. Bharadwaj, et al. (2004). "Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(4): R943-949.
- Bradford, M. M. (1976). "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.
- Braissant, O., F. Fougère, et al. (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat." Endocrinology **137**(1): 354-366.
- Brosnihan, K. B., P. Li, et al. (1996). "Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide." Hypertension **27**(3 Pt 2): 523-528.
- Brosnihan, K. B., P. Li, et al. (1998). "Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation." Biol Res **31**(3): 227-234.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." Science **232**(4746): 34-47.
- Brown, M. S., P. T. Kovanen, et al. (1981). "Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors." Science **212**(4495): 628-635.
- Campagnole-Santos, M. J., S. B. Heringer, et al. (1992). "Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides." Am J Physiol **263**(1 Pt 2): R89-94.
- Caro, J. F., M. K. Sinha, et al. (1996). "Leptin: the tale of an obesity gene." Diabetes **45**(11): 1455-1462.
- Carvalho-Filho, M. A., J. B. Carvalheira, et al. (2007). "[Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes

- mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease]." Arq Bras Endocrinol Metabol **51**(2): 195-203.
- Cassis, L., A. Laughter, et al. (1998). "Cold exposure regulates the renin-angiotensin system." J Pharmacol Exp Ther **286**(2): 718-726.
- Cassis, L. A. (1993). "Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation." Am J Physiol **265**(6 Pt 1): E860-865.
- Cassis, L. A., M. J. Fettinger, et al. (1996). "Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue." Adv Exp Med Biol **396**: 39-47.
- Cassis, L. A., S. B. Police, et al. (2008). "Local adipose tissue renin-angiotensin system." Curr Hypertens Rep **10**(2): 93-98.
- Champe, P. C. (2006). Bioquímica Ilustrada.
- Cheng, Z. J., H. Vapaatalo, et al. (2005). "Angiotensin II and vascular inflammation." Med Sci Monit **11**(6): RA194-205.
- Clark, M. A., D. I. Diz, et al. (2001). "Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells." Hypertension **37**(4): 1141-1146.
- Considine, R. V. and J. F. Caro (1996). "Leptin: genes, concepts and clinical perspective." Horm Res **46**(6): 249-256.
- Cooper, D., K. Y. Stokes, et al. (2002). "Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation." Cardiovasc Toxicol **2**(3): 165-180.
- Crackower, M. A., R. Sarao, et al. (2002). "Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function." Nature **417**(6891): 822-828.
- Dandona, P., A. Aljada, et al. (2005). "Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation." Circulation **111**(11): 1448-1454.
- Deddish, P. A., B. Marcic, et al. (1998). "N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE." Hypertension **31**(4): 912-917.
- Dedonder-Decoopman, E., C. Fievet-Desreumaux, et al. (1980). "Plasma levels of VLDL+ LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and apoproteins B and A-I in a healthy population--influence of several risk factors." Atherosclerosis **37**(4): 559-568.
- Deurenberg, P. and M. Yap (1999). "The assessment of obesity: methods for measuring body fat and global prevalence of obesity." Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **13**(1): 1-11.
- Donoghue, M., F. Hsieh, et al. (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res **87**(5): E1-9.
- Engeli, S., R. Negrel, et al. (2000). "Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system." Hypertension **35**(6): 1270-1277.
- Engeli, S., P. Schling, et al. (2003). "The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?" Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 807-825.
- Fernandes, L., Z. B. Fortes, et al. (2001). "Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo." Hypertension **37**(2 Part 2): 703-709.
- Ferrario, C. M., K. L. Barnes, et al. (1990). "Pathways of angiotensin formation and function in the brain." Hypertension **15**(2 Suppl): I13-19.
- Ferrario, C. M., M. C. Chappell, et al. (1997). "Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)." Hypertension **30**(3 Pt 2): 535-541.
- Ferreira, A. J., S. V. Pinheiro, et al. (2006). "Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein." Regul Pept **137**(3): 128-133.

- Ferreira, A. J., R. A. Santos, et al. (2001). "Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion." Hypertension **38**(3 Pt 2): 665-668.
- Folli, F., C. R. Kahn, et al. (1997). "Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk." J Clin Invest **100**(9): 2158-2169.
- Fontes, M. A., L. C. Silva, et al. (1994). "Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors." Brain Res **665**(1): 175-180.
- Freeman, E. J., G. M. Chisolm, et al. (1996). "Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth." Hypertension **28**(1): 104-108.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, et al. (2001). "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 2005-2010.
- Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.
- Furuhashi, M., N. Ura, et al. (2003). "Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension." Hypertension **42**(1): 76-81.
- Gabriely, I., X. M. Yang, et al. (2001). "Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(3): R795-802.
- Giacchetti, G., E. Faloi, et al. (2002). "Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects." Am J Hypertens **15**(5): 381-388.
- Giacchetti, G., L. A. Sechi, et al. (2005). "The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes." Trends Endocrinol Metab **16**(3): 120-126.
- Giani, J. F., M. A. Mayer, et al. (2009). "Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(2): E262-271.
- Gibbons, G. F. (1990). "Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein." Biochem J **268**(1): 1-13.
- Goebel, R. and M. Schulz (2006). "[A definition of overweight and obesity]." Pharm Unserer Zeit **35**(6): 478-483.
- Gorelik, G., L. A. Carbini, et al. (1998). "Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery." J Pharmacol Exp Ther **286**(1): 403-410.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.
- Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., et al. (2004). "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." Circulation **109**(3): 433-438.
- Guerre-Millo, M. (2004). "Adipose tissue and adipokines: for better or worse." Diabetes Metab **30**(1): 13-19.
- Guyton, A. C. (2006). Textbook of Medical Physiology.
- Hainault, I., G. Nebout, et al. (2002). "Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(1): E59-66.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, et al. (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." Science **269**(5223): 543-546.
- Handa, R. K., S. E. Handa, et al. (2001). "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): F936-947.

- Harp, J. B. and M. DiGirolamo (1995). "Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: changes with maturation and adipose mass enlargement." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **50**(5): B270-276.
- Havel, P. J. (2004). "Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism." Diabetes **53 Suppl 1**: S143-151.
- Jaspard, E., L. Wei, et al. (1993). "Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides." J Biol Chem **268**(13): 9496-9503.
- Jayasooriya, A. P., M. L. Mathai, et al. (2008). "Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6531-6536.
- Jones, B. H., M. K. Standridge, et al. (1997). "Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells." Endocrinology **138**(4): 1512-1519.
- Kabakov, E., C. Norymberg, et al. (2006). "Prevalence of hypertension in type 2 diabetes mellitus: impact of the tightening definition of high blood pressure and association with confounding risk factors." J Cardiometab Syndr **1**(2): 95-101.
- Kane, J. P., D. A. Hardman, et al. (1980). "Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2465-2469.
- Katsuya, T., M. Horiuchi, et al. (1995). "Relations between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and dyslipidemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(6): 779-782.
- Khosla, N. and H. R. Black (2006). "Expanding the definition of hypertension to incorporate global cardiovascular risk." Curr Hypertens Rep **8**(5): 384-390.
- Kotnik, K., E. Popova, et al. (2009). "Inducible transgenic rat model for diabetes mellitus based on shRNA-mediated gene knockdown." PLoS ONE **4**(4): e5124.
- Kovanen, P. T., D. W. Bilheimer, et al. (1981). "Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 1194-1198.
- Koyama, K., G. Chen, et al. (1997). "beta-cell function in normal rats made chronically hyperleptinemic by adenovirus-leptin gene therapy." Diabetes **46**(8): 1276-1280.
- Kucharewicz, I., E. Chabielska, et al. (2000). "The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) closely resembles that of losartan." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **1**(3): 268-272.
- Kucharewicz, I., R. Pawlak, et al. (2002). "Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7)." Hypertension **40**(5): 774-779.
- Kyvelou, S. M., G. P. Vyssoulis, et al. (2006). "Effects of antihypertensive treatment with angiotensin II receptor blockers on lipid profile: an open multi-drug comparison trial." Hellenic J Cardiol **47**(1): 21-28.
- le Tran, Y. and C. Forster (1997). "Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium." J Cardiovasc Pharmacol **30**(5): 676-682.
- Lee, D. M. and P. Alaupovic (1970). "Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation, composition, and immunochemical characterization of low density lipoprotein subfractions of human plasma." Biochemistry **9**(11): 2244-2252.
- Lee, K., J. A. Villena, et al. (2003). "Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1)." J Clin Invest **111**(4): 453-461.

- Lemos, V. S., S. F. Cortes, et al. (2002). "Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats." Br J Pharmacol **135**(7): 1743-1748.
- Lula, I., A. L. Denadai, et al. (2007). "Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence-specific NMR assignments and structural studies." Peptides **28**(11): 2199-2210.
- Lyon, C. J., R. E. Law, et al. (2003). "Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis." Endocrinology **144**(6): 2195-2200.
- Machado, R. D., M. A. Ferreira, et al. (2002). "Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature." Regul Pept **107**(1-3): 105-113.
- Marrero, M. B., D. Fulton, et al. (2004). "Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2009-2013.
- Massiera, F., J. Seydoux, et al. (2001). "Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity." Endocrinology **142**(12): 5220-5225.
- Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C82-97.
- Melki, S. A. and N. A. Abumrad (1993). "Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation." J Lipid Res **34**(9): 1527-1534.
- Miranda, P. J., R. A. DeFronzo, et al. (2005). "Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms." Am Heart J **149**(1): 33-45.
- Murakami, T. and N. Yamada (1997). "[Glucose, protein, and lipid metabolism and their regulation system in adipocyte]." Nippon Rinsho **55 Suppl**: 197-201.
- Nadu, A. P., Ferreira A.J., Reudelhuber T. L., Bader M., Santos R.A.S. (2008). "Reduced isoproterenol-induced renin-angiotensin changes and extracellular matrix deposition in hearts of TGR(A1-7)3292 rats." Journal of the American Society of Hypertension **2**(5): 341-348.
- Ockner, R. K. (1990). "Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins." Mol Cell Biochem **98**(1-2): 3-9.
- Okamoto, Y., S. Kihara, et al. (2002). "Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **106**(22): 2767-2770.
- Osei, S. Y., R. S. Ahima, et al. (1993). "Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds." Eur J Pharmacol **234**(1): 35-42.
- Paula, R. D., C. V. Lima, et al. (1995). "Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats." Hypertension **26**(6 Pt 2): 1154-1159.
- Popova, E., M. Bader, et al. (2005). "Strain differences in superovulatory response, embryo development and efficiency of transgenic rat production." Transgenic Res **14**(5): 729-738.
- Porsti, I., A. T. Bara, et al. (1994). "Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor." Br J Pharmacol **111**(3): 652-654.
- Prasad, A. and A. A. Quyyumi (2004). "Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome." Circulation **110**(11): 1507-1512.
- Rajendran, S., Y. Y. Chirkov, et al. (2005). "Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside." J Cardiovasc Pharmacol **46**(4): 459-463.

- Rankinen, T., J. Gagnon, et al. (1999). "Body fat, resting and exercise blood pressure and the angiotensinogen M235T polymorphism: the heritage family study." Obes Res **7**(5): 423-430.
- Ren, Y., J. L. Garvin, et al. (2002). "Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles." Hypertension **39**(3): 799-802.
- Ribeiro-Oliveira, A., Jr., A. I. Nogueira, et al. (2008). "The renin-angiotensin system and diabetes: an update." Vasc Health Risk Manag **4**(4): 787-803.
- Rodriguez, A., V. Catalan, et al. (2007). "Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome?" Curr Pharm Des **13**(21): 2169-2175.
- Roks, A. J., P. P. van Geel, et al. (1999). "Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system." Hypertension **34**(2): 296-301.
- Rothenbacher, D., H. Brenner, et al. (2005). "Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers." Eur Heart J **26**(16): 1640-1646.
- Safonova, I., J. Aubert, et al. (1997). "Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells." Biochem J **322** ( Pt 1): 235-239.
- Sampaio, W. O., A. A. Nascimento, et al. (2003). "Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(6): H1985-1994.
- Sampaio, W. O., R. A. Souza dos Santos, et al. (2007). "Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways." Hypertension **49**(1): 185-192.
- Sánchez, M. B. (1997). Genes y Obesidad - An. Esp. Pediátrico.
- Santos, E. L., K. de Picoli Souza, et al. (2008). "Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats." Int Immunopharmacol **8**(2): 247-253.
- Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, et al. (2000). "Angiotensin-(1-7): an update." Regul Pept **91**(1-3): 45-62.
- Santos, R. A. and A. J. Ferreira (2007). "Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(2): 122-128.
- Santos, R. A., A. J. Ferreira, et al. (2004). "Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats." Physiol Genomics **17**(3): 292-299.
- Santos, R. A., A. J. Ferreira, et al. (2005). "Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs." Expert Opin Investig Drugs **14**(8): 1019-1031.
- Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, et al. (1996). "Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance." Hypertension **27**(4): 875-884.
- Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, et al. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-8263.
- Santos, S. H., L. R. Fernandes, et al. (2008). "Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism." Diabetes **57**(2): 340-347.
- Santos, S. H. S. (2007). Avaliação dos distúrbios metabólicos produzidos pela deleção genética do receptor de angiotensina-(1-7), Mas, em Camundongos FVB/N. Physiology. Belo Horizonte, UFMG. **Master**.
- Shimabukuro, M., K. Koyama, et al. (1997). "Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4637-4641.



- Shinozaki, K., K. Ayajiki, et al. (2004). "Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance." *Hypertension* **43**(2): 255-262.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(7): 1793-1801.
- Silva, L. C., M. A. Fontes, et al. (1993). "Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla." *Brain Res* **613**(2): 321-325.
- Singh, B. M. and J. L. Mehta (2003). "Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease." *Arch Intern Med* **163**(11): 1296-1304.
- Sjögren B., N. T., Holmgeen H. and Mollerström J. (1938). "Beitrag zur Kenntnis der Leberhythmik (Glykogen, Phosphor und Calcium in der Kaninchenleber)." *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* **240** 427-432.
- Soutar, A. K., N. B. Myant, et al. (1977). "Simultaneous measurement of apolipoprotein B turnover in very-low-and low-density lipoproteins in familial hypercholesterolaemia." *Atherosclerosis* **28**(3): 247-256.
- Spiegelman, B. M. and J. S. Flier (1996). "Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture." *Cell* **87**(3): 377-389.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* **409**(6818): 307-312.
- Strazzullo, P. and F. Galletti (2004). "Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**(3): 325-332.
- Tallant, E. A., C. M. Ferrario, et al. (2005). "Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(4): H1560-1566.
- Tallant, E. A., X. Lu, et al. (1997). "Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor." *Hypertension* **29**(1 Pt 2): 388-393.
- Targher, G., L. Bertolini, et al. (2006). "The International Diabetes Federation definition of the metabolic syndrome independently predicts future cardiovascular events in Type 2 diabetic patients. The Valpolicella Heart Diabetes Study." *Diabet Med* **23**(11): 1270-1271.
- Tom, B., R. de Vries, et al. (2001). "Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade." *Hypertension* **38**(1): 95-99.
- Touyz, R. M. (2005). "Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology." *Antioxid Redox Signal* **7**(9-10): 1302-1314.
- Trayhurn, P. and J. H. Beattie (2001). "Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ." *Proc Nutr Soc* **60**(3): 329-339.
- Tritos, N. A. and C. S. Mantzoros (1997). "Leptin: its role in obesity and beyond." *Diabetologia* **40**(12): 1371-1379.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." *Nature* **389**(6651): 610-614.
- Ventre, J., T. Doebber, et al. (1997). "Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice." *Diabetes* **46**(9): 1526-1531.
- Von Bohlen und Halbach, O., T. Walther, et al. (2000). "Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala." *J Neurophysiol* **83**(4): 2012-2021.
- Walther, T., D. Balschun, et al. (1998). "Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene." *J Biol Chem* **273**(19): 11867-11873.

- Walther, T., J. P. Voigt, et al. (2000). "Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice." Behav Brain Res **107**(1-2): 105-109.
- Walther, T., N. Wessel, et al. (2000). "Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene." Braz J Med Biol Res **33**(1): 1-9.
- Watanabe, T., T. A. Barker, et al. (2005). "Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects." Hypertension **45**(2): 163-169.
- Welches, W. R., R. A. Santos, et al. (1991). "Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin." J Hypertens **9**(7): 631-638.
- Weyer, C., T. Funahashi, et al. (2001). "Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 1930-1935.
- Whitehead, J. P., A. A. Richards, et al. (2006). "Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome." Diabetes Obes Metab **8**(3): 264-280.
- Yamada, K., S. N. Iyer, et al. (1998). "Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7)." Hypertension **32**(3): 496-502.
- Yamamoto, K., M. C. Chappell, et al. (1992). "In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **19**(6 Pt 2): 692-696.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-769.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med **8**(11): 1288-1295.
- Yoshimoto, T., M. Naruse, et al. (1999). "Vasculo-protective effects of insulin sensitizing agent pioglitazone in neointimal thickening and hypertensive vascular hypertrophy." Atherosclerosis **145**(2): 333-340.
- Young, D., G. Waitches, et al. (1986). "Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains." Cell **45**(5): 711-719.

# 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](#)