

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

CARLOS CASTILHO DE BARROS

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS
DEFICIENTES EM LEPTINA E NOCAUTES PARA
RECEPTORES DE CININAS**

Mogi das Cruzes, SP

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

CARLOS CASTILHO DE BARROS

**GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS
DEFICIENTES EM LEPTINA E NOCAUTES PARA
RECEPTORES DE CININAS**

**Tese Apresentada à Universidade de
Mogi das Cruzes como parte dos
requisitos para Obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia.**

Área de Concentração: Biológica

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

Mogi das Cruzes, SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Barros, Carlos Castilho de

Geração e caracterização de camundongos deficientes em leptina e nocautes para receptores de cininas / Carlos Castilho de Barros. – 2009.

123 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

1. Obesidade 2. Receptores – Cininas 3. Ratos -
Leptina 4. Modelos Biológicos I. Araújo, Ronaldo de
Carvalho

CDD 619.93

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

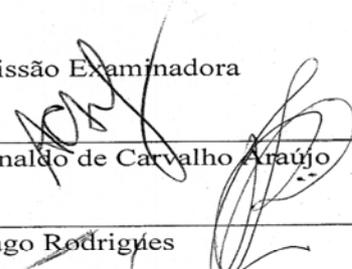
Às catorze horas do dia dezoito de setembro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese "Geração e caracterização parcial de camundongos deficientes em leptina e nocautes para receptores de cininas: desenvolvimento corporal e homeostase da glicose" para obtenção do grau de Doutor pelo(a) candidato(a) **Carlos Castilho de Barros**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 80 (oitenta), a saber: 44 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da Tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Doutor. A Comissão Examinadora foi constituída pelos Senhores Professores Doutores Ronaldo de Carvalho Araújo, Tiago Rodrigues e Ivarne Luis dos Santos Tersariol da Universidade de Mogi das Cruzes, João Bosco Pesquero da Universidade Federal de São Paulo e José Antonio da Silva Jr. da Universidade Nove de Julho, sob a presidência do primeiro, como orientador do aluno. A Sessão Pública da defesa da Tese foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir, a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovado por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 19 de setembro de 2008

Comissão Examinadora

Julgamento

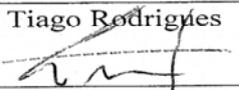


Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

Prof. Dr. Tiago Rodrigues

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))



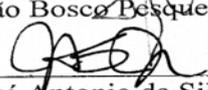
Prof. Dr. Ivarne Luis S Tersariol

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))



Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))



Prof. Dr. José Antonio da Silva Jr.

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

À minha mãe que sempre apoiou todos os meus projetos, sempre sem perguntar, mas mostrando o lado da experiência e da percepção além da visão. Ao meu pai (em memória) que muito sinto saudades, assim como aos meus avôs (em memória) que sempre me passaram sua sabedoria com a delicadeza que só os avôs possuem. A meus irmãos que muito admiro e tenho como porto seguro.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo**, pela amizade, confiança, apoio em tudo e por sua orientação repleta de sabedoria e bons conselhos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. João Bosco Pesquero** pelo exemplo, apoio e colaboração, sem o que este trabalho não seria possível.

Ao meu amigo **Prof. Dr. Jorge Luis Pesquero** pelos longos e inspirados debates científicos, além de outros.

Aos colegas e amigos **Sandro S. Almeida, Thiago Rosa, Anderson Haro, Fernanda Jaqueline Russo** pelo apoio, convivência, ajuda nas horas de trabalho e de lazer.

Ao amigo **João Daivison** pelo apoio e ajuda nas horas difíceis, e pela participação no desenvolvimento das técnicas em colaboração.

Pelos Profs. e Amigos **Dr. Reury Frank Bacurau e Dr. Martin Würtele** por seus exemplos, amizade, ajuda e companheirismo.

Aos colegas do laboratório **Aline, Ana Camila, Édson, Elice, Eliete, Elton, Érika, Felipe, Glória, Hugo, Jamille, Juliana, Kelly, Paula, Rafael, Raphael, Regiane, Renan, Rodrigo, Thais, Valéria, Vicência**.

A minha namorada **Carolina Bellini Parise** pelo carinho, atenção e apoio que me deu nestes últimos meses.

Ao amigo e colaborador **Dr. Edgar Jean Paredes** pelo apoio, amizade e pelas partidas de xadrez que me deixou ganhar.

A todos os Profs. do curso de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes pelo ensinamento passado.

Aos bioteristas dos biotérios de Mogi das Cruzes, do Infar-EPM, do Departamento de Biofísica e CEDEME, pelo cuidado e zelo com os animais.

Aos funcionários do Departamento de Biofísica da UNIFESP, **Seu Nelson, Ivan, Ilza, Fernandez, Cleber** e todos aqueles que estiveram com a gente nesta jornada.

A todos os amigos que torceram e torcem por mim e que estão sempre guardados na memória e no coração, apesar das distâncias.

Às instituições de fomento FAPESP, CAPES e FAEP, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A prevalência de obesidade aumentou na população mundial nas últimas décadas, trazendo consigo as conseqüentes alterações metabólicas e doenças relacionadas como a diabetes, hipertensão e dislipidemia. Apesar deste aumento na prevalência ser conseqüência de alterações ambientais e comportamentais, a obesidade se estabelece devido à existência de características genéticas pré-existentes predispondo as pessoas tanto ao excesso de peso quanto às doenças relacionadas a esta condição. O conhecimento dos genes envolvidos neste processo permitirá o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos, e os modelos animais têm sido uma importante ferramenta para o estudo destes fatores e de suas alterações no organismo como um todo. Os camundongos, em especial, são muito utilizados nas pesquisas por ter uma base genética muito semelhante à do ser humano, por serem pequenos, fáceis de manipular e de criar. O camundongo deficiente para leptina é um dos modelos mais utilizados no estudo da obesidade. Ao mesmo tempo, nas últimas décadas tem sido mostrado que o sistema calcitreína-cininas tem um importante papel no controle do metabolismo interferindo inclusive nas vias de sinalização dos receptores de insulina e leptina. Neste trabalho aplicamos técnicas para reverter a infertilidade dos camundongos *ob/ob* e as usamos para gerar dois novos modelos que combinam as deficiências de leptina e receptores B1 e B2 de cininas. Após a geração dos animais fizemos a caracterização morfológica e glicêmica destes camundongos. Os três genótipos são muito parecidos morfológicamente com pequenas alterações no desenvolvimento corpóreo e na massa de alguns órgãos como baço, fígado e coração. Mostraram também diferentes padrões relativos ao depósito de gordura no tecido adiposo. Os animais deficientes para ambos os receptores de cininas (*ob/obB1B2^{-/-}*) depositam menos gordura inguinal. Foram feitas avaliações glicêmicas dos modelos através de testes de tolerância à glicose e resistência à insulina. Também foi aferida a insulina dos animais. Os camundongos *ob/obB1B2^{-/-}* apresentaram maior resistência à insulina nestes modelos

deficientes em leptina. Esta maior resistência foi compensada nos machos com uma maior liberação de insulina, o que não ocorreu nas fêmeas, as quais, com semelhante quantidade de insulina sérica dos outros genótipos, apresentaram menor tolerância à glicose. Os resultados mostraram que o uso do transplante de tecido adiposo facilita a geração e manutenção de colônias de camundongos deficientes para leptina, aumenta a capacidade de ampliação rápida das colônias e reduz custos e desperdícios de animais. Os animais nocaute para os receptores de cininas apresentam fenótipo diferente de seus controles. Desta forma podem ser usados para elucidar a influência do sistema caliceína-cininas na obesidade mórbida e o comportamento fisiológico deste sistema na ausência de leptina. Estes resultados sugerem que os polimorfismos ligados aos genes do sistema caiceína-cininas são alvos para estudo das causas genéticas da diabetes tipo 2 na obesidade mórbida.

Palavras chaves: 1. Obesidade 2. Cininas 3. Leptina 4. Modelos Biológicos 5. Camundongos

Abstract

The prevalence of obesity increased worldwide in the last decades, bringing the consequent metabolic alterations and related diseases like diabetes, hypertension and dyslipidaemia. Despite this epidemic being a consequence of environmental and behavioural alterations, obesity develops because of pre-existent genetic characteristics which predispose people to both overweight and related diseases. The knowledge of the genes involved in this process will allow the development of more effective treatments and the animal models have been an important tool for the study of these factors and its alterations in organism as a whole. Mice are used very often in research for having genetic basis very similar to human being's, for being small and easy to manipulate and breed. The leptin deficient mouse (*ob/ob*) is one of the most used model in the study of obesity. At the same time, in the last decades it has been shown that the kallikrein-kinin system has an important role on metabolism control interfering even in the signalling pathway of insulin and leptin receptor. In this work we used techniques to revert the infertility of *ob/ob* mice and we used them to generate two new models that combine both leptin and kinin receptors deficiency. After the generation of the animals we made their morphologic and glycaemia characterization. The three genotypes are morphologically similar showing little alterations in body development and weight of some organs like spleen, liver and heart. They show different patterns of fat deposition in adipose tissue. The animals deficient for both kinin receptors (*ob/obB1B2^{-/-}*) have small inguinal fat depots. Glycaemic evaluations were done by glucose tolerance and insulin resistance tests. Insulin levels were also evaluated. The *ob/obB1b2^{-/-}* mice demonstrated more expressive insulin resistance when compared with its controls. That worsened insulin resistance was compensated in males by higher rates of insulin release, which didn't occur in females that with the similar amount of serum insulin as the other genotypes presented lower glucose tolerance. These results showed that the use of adipose tissue transplantation facilitates the generation and

maintenance of leptin deficient mouse colonies, increases the capacity of quick amplification of those colonies and reduces costs and number of non-used animals in these processes. Knockout mice for kinin receptors have different phenotype when compared to its controls and they can be used to elucidate the influence of kallikrein-kinin system in morbid obesity and the physiologic behaviour of this system in the absence of leptin. Therefore, the polymorphisms linked to the kallikrein-kinin system genes are good targets for the study of the genetic causes of type 2 diabetes in morbid obesity.

Key Words: 1. Obesity, 2. Kinins, 3. Leptin, 4. Biological Models, 5.Mice

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação esquemática do sistema caliceína-cininas.....	21
Figura 2: Processamento proteolítico das cininas.....	22
Figura 3: Genotipagem para receptor B1 de cininas.....	38
Figura 4: Genotipagem para o gene do receptor B2 de cininas.....	38
Figura 5: Eletroforese do produto do PCR para o gene da leptina.....	39
Figura 6: Eletroforese do produto da digestão do fragmento do gene da leptina	39
Figura 7: Posição dos locais de restrição da enzima Ddel.....	39
Figura 8: Fenótipo dos animais obesos (<i>ob/ob</i>), magros heterozigotos (<i>OB/ob</i>) e transplantados.....	41
Figura 9: Localização, visualização e procedimento de remoção dos implantes subcutâneos de tecido adiposo.....	42
Figura 10: Alterações nas massas corpóreas dos camundongos <i>ob/ob</i> transplantados.....	42
Figura 11: Níveis séricos de leptina nos animais transplantados com tecido adiposo.....	43
Figura 12: Níveis séricos de insulina dos animais <i>ob/ob</i> implantados.....	44
Figura 13: Comparação temporal entre os níveis séricos, de leptina e insulina, e alterações na massa corporal.....	45
Figura 14: Controle da perda de massa corpórea após transplante.....	46
Figura 15: Histologia dos implantes retirados.....	47
Figura 16: Fêmeas prenhes por macho.....	48
Figura 17: Duração da atividade reprodutiva dos machos transplantados.....	49
Figura 18: Número de filhotes por ninhada.....	49

Figura 19: Diagrama representando os três possíveis cruzamentos para criação de camundongos <i>ob/ob</i>	52
Figura 20: Esquema de cruzamentos tradicional para produção de animais transgênicos e deficientes em leptina	53
Figura 21: Esquema de cruzamentos alternativo para produção de animais transgênicos e deficientes em leptina.....	54
Figura 22: Registro da contração isométrica do músculo liso.....	57
Figura 23: Massa corpórea com 30 semanas.....	58
Figura 24: Curvas de crescimento	59
Figura 25: Massa relativa dos órgãos das fêmeas aos 6 meses de idade	61
Figura 26: Massa relativa dos órgãos dos machos aos 6 meses de idade	62
Figura 27: Massas relativas do coração e de suas câmaras em fêmeas	63
Figura 28: Massas relativas do coração e de suas câmaras em machos.....	64
Figura 29: Comparação entre as massas do coração de machos e fêmeas	64
Figura 30: Massa do tecido adiposo de fêmeas.....	65
Figura 31: Massa do tecido adiposo de machos.....	66
Figura 32: Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de resistência à insulina (TRI) das fêmeas.....	68
Figura 33: Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de resistência à insulina (TRI) dos machos	69
Figura 34: Comparação das curvas glicêmicas entre animais <i>ob/ob</i> e seus controles magros.....	70
Figura 35: Comparação dos protocolos de jejum.....	71
Figura 36: Insulina sérica aos 6 meses de idade.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1: Iniciadores usados para a genotipagem dos receptores de cininas e seus respectivos cassetes de neomicina.....	32
Tabela 2: Fragmentos de DNA esperados na digestão do gene ob.....	40
Tabela 3. Resultado do esquema tradicional de cruzamento para obtenção de ob/obB2 ^{-/-} (sem transplante de tecido adiposo).....	55
Tabela 4. Resultados do esquema alternativo para produção de ob/obB2 ^{-/-} usando o transplante de tecido adiposo.....	55

Lista de Abreviaturas

Acil-CoA – Acil-coenzima-A

ADSC – Células Tronco Derivadas de Tecido Adiposo

AGNE – Ácidos Graxos não Esterificados

AgRP – Proteína Agouti-relacionada

AMP – Adenosina Monofosfato

AMPK – Proteína Quinase Ativada pó AMP

ARC – Núcleo Arqueado

ATP – Adenosina Trifosfato

B1 – Receptor B1 de Cininas

B1-/- Camundongo Nocaute para Receptor B1 de Cininas

B1B2-/- Camundongo Nocaute para Receptores B1B2 de Cininas

B2 – Receptor B2 de Cininas

B2-/- Camundongo Nocaute para Receptor B2 de Cininas

BHE – Barreira Hematoencefálica.

BK – Bradicinina

CART – Transcrito Regulado pela Cocaína

CRP – Proteína C Reativa

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DAG – Diacilglicerol

db – Gene do Receptor de Leptina Mutado

db/db – Camundongo Deficiente em Receptor de Leptina

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GLP-1 – Peptídeo Similar ao Glucagon

GLUT4 – Transportador de Glicose4

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

IL-6 – Interleucina-6

IMC – Índice de Massa Corpórea

IP – Intra Peritoneal
IRS-1 – Substrato 1 do Receptor de Insulina
IRS-2 – Substrato 2 do Receptor de Insulina
LH – Hormônio Luteinizante
Lys-BK – Calidina
Mc4r – Receptor 4 de Melanocortina
MCP-1 – Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
NO – Oxido Nítrico
NPY – Neuropeptídeo Y
OB – Gene da Leptina
ob – Gene da Leptina com mutação
ob/ob – Camundongo deficiente em Leptina.
OB/ob – Camundongo portador da mutação ob.
OBR – Receptor de Leptina
OB-rb – Receptor de Leptina de Cadeia Longa
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PGC-1 – Coativador-1 do PPAR α
PI3K – Fosfatidilinositol-3-OH-quinase
POMC – Pró-opiomelanocorina
PPAR α – Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma- α
PPAR γ - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma- γ
RBP4 – Proteína Ligada ao Retinol-4
RI – Resistência à Insulina
SCC – Sistema Calicreína Cininas
SNC – Sistema Nervoso Central
TA – Tecido Adiposo
TAB – Tecido Adiposo Branco
TAM – Tecido Adiposo Marrom
TG – Triacilglicerol
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α
UCP-1 – Proteína desopladora-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A obesidade no século XXI.....	1
1.2 Doenças resultantes da obesidade.....	3
1.2.1 Diabetes mellitus.....	3
1.2.2 Síndrome metabólica.....	5
1.3 O tecido adiposo.....	7
1.3.1 Função endócrina do tecido adiposo.....	8
1.3.2 A leptina na regulação homeostasia do organismo.....	10
1.4 Camundongos modelos de obesidade.....	13
1.4.1 Camundongos ob/ob.....	15
1.5 Transplante de tecido adiposo.....	18
1.6 Sistema Calicreína-cininas.....	19
1.6.1 Camundongos Nocaute para os Receptores de Cininas	23
1.6.1.1 Camundongo deficiente para o receptor B2.....	23
1.6.1.2 Camundongo deficiente para o receptor B1	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos Gerais.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODO	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Transplante de Tecido Adiposo Branco.....	28
3.3 Curva de crescimento padrão.....	30
3.4 Mensuração de leptina e insulina sérica.....	30
3.5 Análise histológica	30
3.6 Genotipagem.....	31
3.6.1 Genotipagem do gene <i>OB</i> :.....	31
3.6.2 Genotipagem do gene dos receptores de cininas:.....	33

3.7 Análise de contração de músculo liso de estômago (Análise fenotípica) ..	35
3.8 Desenvolvimento corporal dos animais <i>ob/obB2-/-</i> , <i>ob/obB1B2-/-</i> e controles	36
3.9 Glicemia, curva glicêmica e teste de resistência a Insulina	36
3.10 Coleta de órgãos.....	36
3.11 Coleta de amostras de sangue e extração de soro.....	37
3.12 Estatística.....	437
4 RESULTADOS	38
4.1 Genotipagem.....	38
4.2 Transplante de tecido adiposo.....	40
4.3 Análise de contração de músculo liso de estômago (Análise fenotípica molecular)	56
4.4 Desenvolvimento corporal dos animais gerados.....	58
4.5 Massa dos órgãos.....	60
4.5.1 Coração e câmaras cardíacas	63
4.6 Massa do Tecido adiposo	65
4.7 Glicemia e Insulinemia.....	67
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	86
7 REFERÊNCIAS	87
8 ANEXOS	119
Anexo 1	119
Anexo 2	122

1 Introdução

1.1 A obesidade no século XXI

A obesidade é uma condição do organismo na qual a reserva de energia, que está armazenada na forma de gordura, apresenta-se aumentada e está associada a certas doenças e ao aumento da taxa de mortalidade. Apesar de se tratar de uma condição clínica do indivíduo, tem sido vista como um grave problema de saúde pública (MOKDAD *et al.*, 1999; MOKDAD *et al.*, 2001; FLEGAL *et al.*, 2002; MOKDAD *et al.*, 2004; FLEGAL *et al.*, 2005). O excesso de reserva energética na forma de triglicerídeos (triacilglicerol, TG) no organismo dos mamíferos, incluindo humanos, predispõe a doenças diversas como distúrbios cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólica, osteoartrite e apnéia do sono (MALNICK e KNOBLER, 2006).

Durante milhões de anos, a evolução da espécie humana, assim como de outros mamíferos, foi feita pela pressão de seleção natural em um ambiente onde muitas vezes havia a escassez de alimentos (BELLISARI, 2008). O indivíduo, além de ser capaz de se defender contra as agressões do meio ambiente, de outros animais ou microrganismos patogênicos, precisava dispor de mecanismos regulatórios eficientes que lhe permitisse preservar uma quantidade adequada de energia para sua sobrevivência e reprodução. Um sofisticado sistema de regulação da massa corpórea, envolvendo diversos mecanismos e sistemas orgânicos como o sistema nervoso límbico, autônomo e endócrino, foi desenvolvido e selecionado de forma a reagir eficientemente sempre no sentido de preservar a quantidade de energia armazenada. Este sistema sofreu muito pouca pressão de seleção no sentido oposto, ou seja, poucos dispositivos foram desenvolvidos para evitar que houvesse um aumento excessivo da massa corpórea. Desta forma o organismo humano é muito eficiente para impedir a perda da massa corpórea e conseqüentemente das reservas energéticas, mas

pouco eficiente na regulação do excesso de peso (KEESEY e HIRVONEN, 1997; BELLISARI, 2008).

Uma importante mudança ambiental ocorreu no final do século XX com relação à qualidade e disponibilidade de alimentos, e também no tipo de atividade laboral desenvolvida pelas pessoas de muitos países, principalmente dos países mais desenvolvidos (MOKDAD *et al.*, 1999). O estilo de vida contemporâneo das pessoas residentes nestes locais, onde há grande fartura de recursos financeiros e de oferta de alimentos prontos, os chamados “fast-foods”, favorece a ingestão excessiva de calorias. Somado a esse fato ocorreu a redução da atividade física despendida no desenvolvimento das atividades diárias relativas às novas profissões, favorecendo o surgimento da obesidade (MANSON *et al.*, 2004; BELLISARI, 2008).

Em geral indivíduos são considerados obesos se o índice de massa corporal ($IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$) for maior que 30, e apresentam sobrepeso se o mesmo estiver entre 25 e 30. No entanto, outros critérios mais exatos podem ser utilizados para definir pacientes com obesidade, dentre eles a relação cintura/quadril e a porcentagem de gordura corporal.

Entre 1991 e 2000, nos Estados Unidos das Américas, houve um aumento de 12,0% a 19,8% na incidência da obesidade na população ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, índice usado por Mokad e cols.). Em alguns estados o índice de obesos chegava a 24,3 % em 2000 (MOKDAD *et al.*, 1999; MOKDAD *et al.*, 2001). Esta tendência tem se repetido em diversos países como Itália e Brasil (CALZA *et al.*, 2008). Em nosso país, o número de pessoas com sobrepeso vem aumentando anualmente chegando a taxas acima de 50 % ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) em mulheres entre 40 e 79 anos nas regiões do nordeste e sudeste do país (ABRANTES *et al.*, 2003).

O aumento nos índices de obesidade traz conseqüências à Saúde Pública, pois esta condição predispõe a diversas doenças, como a diabetes e a hipertensão. No Brasil foram gastos US\$ 243,9 milhões por ano (2,2% do Orçamento do Ministério da Saúde), entre 1999 e 2001, unicamente com

internações atribuídas à diabetes mellitus (Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 17(2):123-153, abr-jun 2008).

1.2 Doenças resultantes da obesidade

A obesidade, assim como a condição que a precede, ou seja, o excesso de massa corpórea, tem aumentado em todo o planeta nas últimas décadas e estão ligadas a diversas causas como as genéticas, metabólicas, comportamentais e ambientais (MALNICK e KNOBLER, 2006; TOSCHKE *et al.*, 2008). O rápido aumento da prevalência da obesidade sugere que causas ambientais e de comportamento sejam as influências predominantes para a atual pandemia desta condição biológica (ROWLAND *et al.*, 2008).

Uma associação direta entre obesidade e doenças como diabetes mellitus, hipertensão e doenças cardíacas isquêmicas já está bem conhecida. Existe uma correlação muito forte entre o excesso de massa corpórea e a mortalidade dos indivíduos, aumentando o risco de óbito com o aumento do IMC destas pessoas (YANAI *et al.*, 2008). Fatores como o tabagismo e o estresse aumentam as chances de mortalidade nesse grupo de pessoas. Nos últimos anos a morte por doenças relacionadas à obesidade tem reduzido, apesar do aumento da prevalência de pessoas obesas, principalmente pelos avanços nos cuidados médicos e preventivos destas doenças (MALNICK e KNOBLER, 2006).

Este trabalho visa o estudo da obesidade no que se refere principalmente à resistência à insulina e à homeostase da glicose. Desta forma procuraremos descrever as bases moleculares envolvidas nestes processos.

1.2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é o nome dado a um grupo de doenças relacionadas com a condição de hiperglicemia persistente. Sua patogênese é complexa e

envolve diversas alterações metabólicas e endócrinas alterando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Esta condição pode ser devida a falta ou insuficiência na secreção de insulina (diabetes tipo 1), ou no desenvolvimento de resistência a este hormônio pancreático (diabetes tipo 2). A diabetes do tipo 1 é causada pela destruição das células beta das ilhotas pancreáticas por um processo auto-imune, desencadeado em pessoas geralmente jovens. A falta de insulina torna os tecidos muscular e adiposo incapazes de absorverem a glicose sanguínea de forma adequada. Estas pessoas costumam ser magras e o tratamento constitui da reposição do hormônio através de injeções. A diabetes mellitus tipo 2 costuma ter seu aparecimento mais tardio, apesar de sua incidência ter aumentado em crianças e adolescentes nas duas últimas décadas. Ela é caracterizada pelo aumento dos níveis glicêmicos relacionado à resistência à insulina (RI). Várias teorias estão sendo estudadas quanto às causas do aparecimento desta condição, mas seu complexo mecanismo fisiológico ainda não foi completamente elucidado.

Existe uma forte associação entre obesidade e diabetes mellitus tipo 2. Esta correlação persiste em ambos os gêneros e em qualquer grupo étnico. O ganho de peso parece preceder o aparecimento da condição de diabetes, a qual está relacionada principalmente à condição de RI e a disfunção das células β das ilhotas pancreáticas (KAHN, 2001). Tanto a obesidade quanto a diabetes tipo 2 estão associadas a RI, mas a maioria dos obesos não desenvolve hiperglicemia. Em condições normais, as células β das ilhotas pancreáticas, reagem à diminuição da sensibilidade à insulina com uma maior liberação de seus grânulos citoplasmáticos na circulação, sobrepondo à resistência e mantendo normal o índice glicêmico e a tolerância à glicose (PERLEY e KIPNIS, 1966; POLONSKY *et al.*, 1988; REAVEN e CHEN, 1988; KAHN *et al.*, 1993). Para a obesidade e a RI estarem relacionadas com a diabetes tipo 2, é necessário que a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas seja insuficiente para compensar a redução na sensibilidade à insulina (KAHN, 2001). Disfunção das células β ocorre em indivíduos que ainda não apresentam diabetes tipo 2. Estes apresentam glicemia normal, estão predispostos à doença, mas suas células produtoras de insulina já

mostram alterações na resposta aos estímulos secretores de insulina, sendo este um estágio anterior ao desenvolvimento de diabetes (KAHN, 2001).

Flutuações na sensibilidade à insulina durante a vida do indivíduo é uma condição fisiológica normal e comum. Resistência à insulina é observada na gestação (BUCHANAN *et al.*, 1990), na puberdade (MORAN *et al.*, 1999) e com o envelhecimento (DEFRONZO, 1979). Por outro lado, alterações no estilo de vida, como o consumo de carboidratos (CHEN *et al.*, 1988) e aumento de atividade física regular (GOODYEAR e KAHN, 1998), aumentam a sensibilidade à insulina.

A liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) pelo tecido adiposo pode ser o fator crítico mais importante na modulação da sensibilidade à insulina. Os AGNEs estão associados com a RI e sua liberação está aumentada tanto na obesidade quanto na diabetes tipo 2 (REAVEN *et al.*, 1988; BODEN, 1997). Apenas algumas horas após o aumento de AGNEs no sangue de humanos inicia-se a instalação da RI (RODEN *et al.*, 1996), e inversamente, a sensibilidade à insulina aumenta com a administração de drogas antilipogênicas devido à diminuição aguda dos AGNEs (SANTOMAURO *et al.*, 1999). O mecanismo molecular envolvido no aumento da RI pelos AGNEs pode estar ligado ao aumento dos metabólitos resultantes da oxidação de uma excessiva quantidade intracelular de ácidos graxos, como o diacilglicerol (DAG), acil-coenzima-A (Acil-CoA), e ceramidas, os quais ativam a cascata da serina/treonina quinase levando à fosforilação de serina e treonina no substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e substrato do receptor de insulina-2 (IRS-2) diminuindo sua capacidade de ativar a PI3K (SHULMAN, 2000) e conseqüentemente reduzindo os eventos subseqüentes da cascata ativada pelo receptor de insulina.

1.2.2 Síndrome Metabólica

Na década de 20, Eskil Kylin descreveu pela primeira vez a associação entre hipertensão, hiperglicemia e gota (KYLIN, E, 1923). No entanto, foi só com o aumento da prevalência da obesidade nos últimos anos que pesquisadores e

clínicos passaram a utilizar o termo “síndrome metabólica” para agrupar indivíduos que apresentavam obesidade e dois ou mais sintomas associados, com o intuito de facilitar o diagnóstico, o tratamento e o estudo desses pacientes (ALBERTI *et al.*, 2005).

Uma característica comum às diversas patologias associadas à síndrome metabólica é a participação do processo inflamatório como importante agente etiopatogênico. A obesidade, por exemplo, é considerada um quadro de inflamação crônica moderada (DANDONA *et al.*, 2004; WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005; TILG e MOSCHEN, 2006). Essa conclusão é oriunda de trabalhos mostrando que mediadores inflamatórios estão aumentados em pacientes obesos, dentre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a proteína C reativa (CRP), a interleucina 6 (IL-6) e o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (revisados por DANDONA *et al.*, 2004). Além disso, inúmeros estudos sugerem uma importância para esses mediadores inflamatórios no desenvolvimento das doenças associadas à obesidade. O TNF α , a IL-6 e a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) são alguns dos agentes pró-inflamatórios que também são considerados potentes indutores de resistência à insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; KANDA *et al.*, 2006). A administração crônica de TNF α em camundongos é capaz de inibir várias etapas da cascata de sinalização da insulina, levando à diminuição da atividade de tirosina quinase do receptor de insulina, da fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) (FEINSTEIN *et al.*, 1993) e da síntese do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) (STEPHENS e PEKALA, 1991). Além disso, animais obesos em que a função do TNF α foi perdida, tanto pela deleção do gene que codifica o TNF α quanto os que codificam seus receptores, apresentam um aumento significativo da sensibilidade à insulina sistêmica.

Os mecanismos gerais pelos quais a inflamação induz resistência à insulina foram propostos recentemente. De maneira geral, as citocinas inflamatórias são capazes de induzir estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, que foram relacionados ao desenvolvimento de resistência à insulina (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005). Dessa maneira, os estímulos

inflamatórios e o estresse celular resultam na ativação de serina/treonina quinases, como a quinase c- Jun-N-terminal (JNK) e o inibidor da quinase do fator nuclear κ B (IKK), e assim contribuem para a inibição da sinalização da insulina (ZICK, 2003).

Além do importante papel na regulação da homeostase glicêmica, os mediadores inflamatórios aumentados na obesidade, em particular o TNF α , o PAI-1 e a CRP, estão associados ao maior risco de aterosclerose em camundongos obesos (SAMAD e LOSKUTOFF, 1999). Finalmente, algumas citocinas pró-inflamatórias estão relacionadas ao desenvolvimento de dislipidemia, hipertensão e outras doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (FERNANDEZ-REAL e RICART, 2003).

1.3 O tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é um tecido presente apenas em animais e que tem como principal característica a capacidade de armazenar grande quantidade de lipídeos na forma de triacilglicerol (TG). Classificado como um tecido conjuntivo, tem sua origem no mesoderma e está distribuído por todo o organismo animal, na forma de grandes massas teciduais localizadas em regiões específicas como no subcutâneo e peritônio, mas também em pequenas quantidades associadas a outros tecidos como o tecido conjuntivo propriamente dito, medula óssea e músculo esquelético. Conforme o tipo celular e função, o tecido adiposo pode ser dividido em dois tipos: o tecido adiposo marrom (multilocular); e o tecido adiposo branco (unilocular). O tecido multilocular está presente apenas em pequenas quantidades nos mamíferos adultos, com exceção dos animais que hibernam, sendo mais abundantes nos neonatos inclusive no humano. As células deste tecido apresentam grande quantidade de pequenas vesículas de armazenamento de TG rodeadas por inúmeras mitocôndrias. A grande quantidade de mitocôndrias e proteínas desacopladoras (proteínas capazes de transferir prótons do espaço intermembranas das mitocôndrias para a matriz mitocondrial sem a

passagem pelo complexo protéico chamado ATP-Sintase), trás a este tecido a propriedade de produção de energia térmica, estando este relacionado a termo-regulação em animais homeotermos.

O tecido adiposo branco (TAB) está presente em maior quantidade nos organismos que o tecido adiposo marrom, e é o principal tecido de armazenamento de energia na forma de lipídeos nos vertebrados. Suas células têm um núcleo oval, e uma pequena quantidade de citoplasma, ambos deslocados para as extremidades da célula por uma enorme vesícula repleta de lipídeos na forma de TG. Estas células chamadas de adipócitos são abastecidas por uma rede de vasos sanguíneos e entremeadas por células do sistema imune, principalmente os macrófagos. Além destas células, encontramos entre os adipócitos, células progenitoras cuja nomenclatura extensa e variada muitas vezes se refere a um mesmo tipo celular. Estas células, antigamente conhecidas simplesmente como preadipócitos, hoje são reconhecidas pela sua capacidade de formar diversos tipos celulares como fibroblastos, condroblastos, miócitos, osteoblastos, neurônio, vasos sanguíneos e adipócitos. Desta forma o termo préadipócito tem sido substituído para dar lugar a termos como células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo, células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC), células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, células-tronco mesenquimais, células mesenquimais, células progenitoras mesenquimais, entre outros. As ADSCs fazem parte de um sistema de reposição celular no TAB finamente regulado. Em 2008, SPALDING e cols. demonstraram que o TAB está em contínua renovação celular e estimaram que aproximadamente 10% dos adipócitos são renovados todos os anos e que este pode ser um alvo importante para o tratamento da obesidade (SPALDING *et al.*, 2008). A quantidade de ADSCs no TAB nunca antes foi relacionada com as cininas e seus receptores, sendo motivo de estudo neste trabalho.

1.3.1 Função endócrina do tecido adiposo

Até 15 anos atrás, o TA era visto apenas como um tecido de armazenamento de gordura, proteção contra choques mecânicos e isolamento térmico. A partir da identificação e seqüenciamento do gene da leptina em 1994 (ZHANG *et al.*, 1994), o tecido adiposo passou a ser reconhecido como um importante sinalizador para a regulação da homeostase do organismo. Este reconhecimento da função endócrina do tecido adiposo desencadeou uma corrida para se identificar outras substâncias produzidas no TA que tivessem função reguladora. De fato estes estudos resultaram na identificação de diversos fatores que foram genericamente chamados de adipocinas (GREGOIRE, 2001; FANTUZZI, 2005; TRAYHURN e WOOD, 2005). Hoje é conhecido que o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da síndrome metabólica é a obesidade. O TA modula o metabolismo liberando ácidos graxos não esterificados (AGNEs), glicerol, hormônios e citocinas pró-inflamatórias (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005; SCHERER, 2006; SHOELSON *et al.*, 2006). Diversos destes produtos do TA estão ligados à RI e têm sua produção aumentada na obesidade. De modo resumido podemos citar alguns deles como: a) a proteína ligada ao retinol-4 (RBP4), que induz a RI pela redução da sinalização da fosfatidilinositol-3-OH-quinase (PI3K) no músculo e aumenta a expressão da enzima fosfoenolpiruvato-quinase no fígado, aumentando a gliconeogênese (YANG *et al.*, 2005); b) a adiponectina que age inversamente a anterior aumentando a sensibilidade à insulina pela estimulação da oxidação dos ácidos graxos de maneira dependente da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e dos receptores proliferadores peroxissomais alfa (PPAR- α) (KADOWAKI *et al.*, 2006; SCHERER, 2006); c) fatores liberados por outras células que fazem parte da população do TA como o fator de necrose tecidual- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e produtos adicionais de macrófagos que podem estar ligados ao desenvolvimento da diabetes (FAIN *et al.*, 2004; WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005). Os fatores do

item “c” são mediadores de inflamação além de atrair macrófagos para o tecido adiposo desencadeando um processo auto-alimentado de inflamação e atração de células inflamatórias podendo estar ligados à resistência à insulina (WEISBERG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003).

Dois principais compartimentos mantêm depósitos de TA: a cavidade abdominal e o tecido subcutâneo. As células do TA destes diferentes depósitos têm metabolismos diferentes, como por exemplo: a gordura abdominal expressa mais genes que codificam proteínas secretórias e proteínas responsáveis por produção de energia (MAEDA *et al.*, 1997). A quantidade de proteínas liberadas pelos TAs também diferem com relação a sua posição anatômica (MOTOSHIMA *et al.*, 2002; FAIN *et al.*, 2004). A secreção de adiponectina pelos adipócitos omentais é maior do que aquela aferida nos adipócitos do tecido subcutâneo, e a quantidade liberada por estes adipócitos está mais fortemente relacionada negativamente ao índice de massa corpórea (IMC) nos humanos (MOTOSHIMA *et al.*, 2002). Pequenos adipócitos expressam mais adiponectina que os grandes adipócitos, e o TA omental possui células menores que o TA subcutâneo (REYNISDOTTIR *et al.*, 1997). Embora cada célula do TA omental secrete mais adiponectina, o tecido adiposo subcutâneo é muito mais volumoso e é o principal responsável pelos níveis de adiponectina circulantes.

O TA intra-abdominal é mais lipolítico e menos sensível ao efeito antilipolítico da insulina (MONTAGUE e O'RAHILLY, 2000). Estas características fazem com que ele libere grandes quantidades de AGNEs. Devido a sua posição anatômica, estas moléculas são liberadas diretamente no sistema porta expondo rapidamente o fígado a concentrações altas de AGNEs, o que não ocorre quando a lipólise é proveniente do TA periférico. Isso pode explicar porque o fígado se torna resistente à insulina enquanto que os tecidos periféricos ainda não o são (KIM *et al.*, 2003).

1.3.2 A leptina na regulação da homeostasia do organismo

Muitos genes e seus produtos têm sido relacionados à obesidade. Dentre estes, a leptina, produto da expressão do gene *OB*, tem um papel fundamental. Leptina é um importante hormônio com diversas funções. Ela é produzida principalmente no TA, assim como, em pequenas quantidades, em outros órgãos e tecidos como o estômago (BADO *et al.*, 1998), o epitélio mamário (CASABIELL *et al.*, 1997), a placenta (HOGGARD *et al.*, 1997; MASUZAKI *et al.*, 1997; CASTELLUCCI *et al.*, 2000), o músculo esquelético e o coração (CASABIELL *et al.*, 1997). A leptina tem influência em várias funções biológicas incluindo a reprodução (iniciação da puberdade), as respostas imunes e inflamatórias (LAM e LU, 2007), hematopoiese (FANTUZZI e FAGGIONI, 2000), angiogênese (RAHMOUNI e HAYNES, 2005) e formação óssea (KARSENTY, 2001). A leptina é primariamente relacionada com a obesidade porque faz parte de um mecanismo de “realimentação” que sinaliza aos centros reguladores no sistema nervoso central (SNC) diminuindo a ingestão de alimentos e promovendo a regulação da massa corpórea e do gasto energético. Esta sinalização da leptina ao sistema nervoso central tem sido demonstrada em numerosos experimentos com modelos animais (HOFBAUER, 2002). O gene *OB* humano está localizado no cromossomo 7 (7q31.3) e é composto por três exons e dois íntrons formados por 18 kb (ISSE *et al.*, 1995; GONG *et al.*, 1996). O gene codifica para uma proteína constituída de 166 aminoácidos incluindo o peptídeo sinal (MASUZAKI *et al.*, 1995).

A leptina age principalmente através do receptor de leptina (*OBR*). O gene *OBR* está localizado no cromossomo 1 (1p31) em humanos e é constituído de 18 exons e 17 introns. O gene codifica para uma proteína com 1162 aminoácidos (CHUNG *et al.*, 1996; MEIER e GRESSNER, 2004). Existem algumas isoformas entre os produtos do *OBR* e uma das variantes de “splice” produzida por este gene produz a maior isoforma do receptor contendo o mais longo domínio intracelular (*OB-rb*). Esta é a isoforma que tem a capacidade de sinalizar para a célula ativando o efeito da leptina, e está constitutivamente expressa no cérebro

humano (CAMPFIELD *et al.*, 1996; BURGUERA *et al.*, 2000; HEGYI *et al.*, 2004) sendo altamente expressa no hipotálamo e cerebelo (CONSIDINE *et al.*, 1996; BURGUERA *et al.*, 2000).

A liberação de leptina tem uma forte correlação com a quantidade de TA no organismo e desta forma sinaliza ao SNC a quantidade de energia estocada (FREDERICH *et al.*, 1995; WEIGLE *et al.*, 1997). Desta forma quanto maior a quantidade de TA maior a quantidade de leptina circulante. Os indivíduos obesos possuem uma maior quantidade deste hormônio anorexígeno do que os indivíduos magros, mas, paradoxalmente, possuem maior apetite (SCHWARTZ, PESKIND *et al.*, 1996). Para a leptina fazer sua ação no SNC ela precisa passar pela barreira hematoencefálica (BHE). Somente desta forma ela encontra seus receptores no SNC sinalizando a quantidade de energia estocada e ativando a regulação da ingestão alimentar e do gasto energético, ajudando assim a regular a quantidade de gordura estocada (HALAAS *et al.*, 1995; PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995; JORGENSEN *et al.*, 1998; FAROOQI *et al.*, 2001; JEON *et al.*, 2003; LICINIO *et al.*, 2004).

Muitos fatores têm influência nos níveis circulantes de leptina. Por exemplo, a quantidade de leptina produzida pelo TA pode ser influenciada pelo comportamento alimentar (KOLACZYNSKI, CONSIDINE *et al.*, 1996; KOLACZYNSKI, OHANNESIAN *et al.*, 1996; KORBONITS *et al.*, 1997; WEIGLE *et al.*, 1997; LEVINE *et al.*, 1999). Tanto a superalimentação por curto prazo (12 h) quanto por longo prazo (2 a 8 semanas) resulta em aumento da expressão de leptina e aumento dos níveis deste hormônio no sangue de pessoas saudáveis (KOLACZYNSKI, OHANNESIAN *et al.*, 1996; LEVINE *et al.*, 1999). Os níveis séricos de leptina também são maiores em mulheres do que em homens (OSTLUND *et al.*, 1996; KENNEDY *et al.*, 1997; SAAD *et al.*, 1997), diminuem com o envelhecimento (OSTLUND *et al.*, 1996), são reduzidos no exercício físico e com o treinamento (HICKEY *et al.*, 1997; KELLER *et al.*, 2005) e aumentam com a ingestão de glicose (WELLHOENER *et al.*, 2000).

A leptina exerce seus efeitos regulatórios centrais de controle da ingestão de alimentos e massa corpórea através de seus receptores localizados no

hipotálamo (SCHWARTZ, SEELEY *et al.*, 1996; VAISSE *et al.*, 1996; SATOH *et al.*, 1997). Ao se ligar a estes receptores a leptina influencia a atividade de vários neurônios hipotalâmicos e a expressão de vários neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos. Os peptídeos anorexígenos que têm sua expressão influenciada pelos níveis de leptina incluem: pró-opiomelanocortina (POMC), transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), neurotensina, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e fator neurotrófico derivado do cérebro (GOLDEN *et al.*, 1997; KRISTENSEN *et al.*, 1998; SAHU, 1998; MEISTER, 2000; BARIOHAY *et al.*, 2005). Entre os peptídeos orexígenos cuja expressão sofre influência da ação da leptina é importante citar o neuropeptídeo Y (NPY), o hormônio concentrador de melanina, a proteína agouti-relacionada (AgRP), a galanina e o peptídeo semelhante à galanina (SCHWARTZ, SEELEY *et al.*, 1996; SAHU, 1998; LOPEZ *et al.*, 2000; MEISTER, 2000; ARVANITI *et al.*, 2001; KUMANO *et al.*, 2003).

Os neurônios anorexígenos e orexígenos estão localizados em regiões específicas do hipotálamo como no núcleo arcado (ARC), hipotálamo lateral, núcleo paraventricular e hipotálamo perifornical (COWLEY *et al.*, 2003). Estes neurônios reguladores interagem entre si para o controle influenciando o controle da ingestão alimentar (TRITOS *et al.*, 1998; HORVATH *et al.*, 1999; COWLEY *et al.*, 2003).

1.4 Camundongos modelos de obesidade

O desenvolvimento de modelos animais de obesidade é uma importante ferramenta para o estudo e desenvolvimento de tratamentos para esta condição em humanos. Os camundongos são modelos ideais, pois possuem genética similar a dos seres humanos, são pequenos, de fácil manipulação, sendo fáceis de manter e criar. Atualmente as técnicas de manipulação genética destes animais se tornaram rotineiras nos laboratórios. Por isso, muitas das pesquisas

sobre a etiologia da obesidade em humanos são feitas em modelos de camundongos.

A obesidade é uma característica fácil de observar nos camundongos e várias alterações genéticas que estão envolvidas com esta condição já estão bem caracterizadas. Dos modelos, o mais antigo deles é o que possui a mutação no gene *agouti*, entretanto os modelos de obesidade que possuem mutações no gene do hormônio da saciedade leptina (*ob*) ou no seu receptor (*db*) são os mais estudados (PERRY *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1994; TARTAGLIA *et al.*, 1995). Camundongos apresentando estas mutações são hiperfágicos e desenvolvem obesidade severa logo após o desmame. Eles desenvolvem também forte resistência à insulina, baixo gasto energético e infertilidade. A administração de leptina em camundongos *ob/ob* reverte o seu fenótipo com perda de peso devida a redução da ingestão alimentar, normalização dos níveis glicêmicos e de insulina sérica e recuperação da fertilidade. Pessoas deficientes para leptina são raras, entretanto este modelo é muito usado para a compreensão dos efeitos da leptina e sua sinalização nas células. Os animais *db/db* possuem leptina mas não possuem seus receptores funcionais (CHARLTON, 1984), não sendo sensíveis à aplicação de leptina exógena. Este modelo é mais usado para o estudo de resistência à leptina.

Outros modelos animais de obesidade incluem *tuddy* e carboxipeptidase E (NAGGERT *et al.*, 1995; KLEYN *et al.*, 1996). O camundongo *tuddy* desenvolve obesidade de início tardio, mas o mecanismo para esta resposta é desconhecido. Esta mutação está associada com degeneração de retina e surdez hereditárias. A proteína codificada pelo gene *tuddy* parece ser um fator de transcrição ativado por receptores acoplados a proteína G (SANTAGATA *et al.*, 2001), mas os genes regulados pela proteína *tuddy* ainda não estão bem descritos. Mutações homólogas ao gene *tuddy* em humanos foram encontradas, mas não parecem levar à obesidade. O gene da carboxipeptidase E codifica uma enzima ligada às alterações pós traducionais de muitos pró-hormônios, incluindo pró-insulina e pró-opiomelanocortina. Desta forma há uma redução da liberação de ligantes do receptor de melanocortina presente no hipotálamo, diminuindo assim a resposta

da melanocortina pela leptina, causando hiperfagia, obesidade tardia além de resistência à insulina e infertilidade nos animais. Isso indica que a infertilidade causada pela deficiência de leptina também pode estar ocorrendo através do sistema melanocortina. Estes modelos podem ser úteis para o estudo de raros casos de obesidade e diabetes tipo 2 em pessoas portadoras de mutação no gene da carboxipeptidase E.

A mais de um século foi descrito um camundongo com obesidade genética e de coloração amarelada chamado de camundongo *agouti*. Entretanto o gene *agouti* foi clonado e identificado somente em 1992 (BULTMAN *et al.*, 1992). O gene *agouti* é expresso apenas de forma transiente nos melanócitos produzindo um pigmento amarelo/vermelho (feomelanina) e inibindo a produção do pigmento eumelanina que tem cor marrom (LU *et al.*, 1994; MILLAR *et al.*, 1995). A regulação do gene da feomelanina é feita pelo hormônio melanócito-estimulador alfa através de sua ligação ao receptor de melanocortina-1. A expressão ectópica do gene *agouti* ocorre em 5 diferentes linhagens de camundongos. Algumas delas produzem animais com coloração alterada, obesidade tardia, diabetes tipo 2, hiperlipidemia e infertilidade. A expressão ectópica da proteína *agouti* tem sido responsabilizada por estes efeitos (KLEBIG *et al.*, 1995). Em humanos, *agouti* é expressa em diversos tecidos inclusive no tecido adiposo, sugerindo que pode estar envolvida no controle do metabolismo energético (KWON *et al.*, 1994). A expressão aumentada da proteína *agouti* no tecido adiposo de um modelo transgênico de camundongo gerou animais mais pesados, sem que eles comessem mais que seus controles, sugerindo que o aumento da massa corpórea seja devido à alteração do gasto energético (MYNATT *et al.*, 1997). Os efeitos da proteína *agouti* estão relacionados ao sistema da melanocortina, em especial ao receptor 4 de melanocortina (Mc4r) localizados no hipotálamo (CONE *et al.*, 1996).

Outros animais têm sido gerados para o estudo das alterações metabólicas relacionadas com a obesidade. Entre eles podemos citar o camundongo nocaute para Mc4r, com obesidade juvenil e diabetes independente de insulina; o nocaute para o Neuro-peptídeo Y (NPY), o qual apresenta ingestão

normal, mas que quando cruzado com animal *ob/ob* apresenta redução na ingestão alimentar e massa de tecido adiposo, aumento na temperatura corpórea e da atividade espontânea. Outros modelos como o descrito, que combina animais *ob/ob* com outros tipos de alterações genéticas são muito úteis para o estudo da obesidade. Como exemplos, podemos citar os cruzamentos entre os animais *ob/ob* com o camundongo nocaute para o fator de necrose tumoral (WELLEN *et al.*, 2004), com o nocaute para o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (SCHAFER *et al.*, 2001), com o nocaute para a proteína semelhante ao glucagon-1 (SCROCCHI *et al.*, 2000), o animal deficiente para interleucina-10 (SIEGMUND *et al.*, 2004), entre outros.

1.4.1 Camundongos *ob/ob*

A síndrome *ob/ob* em camundongos foi descoberta em 1950 em uma colônia de camundongos domésticos e foi transferida para a colônia de camundongos C57BL, que já era bem caracterizada na década de 50 (INGALLS *et al.*, 1950), através de cruzamentos. Por apresentarem obesidade juvenil severa, hiperfagia, hiperinsulinemia e hiperglicemia (MAYER *et al.*, 1953; GARTHWAITE *et al.*, 1980), tornaram-se um dos modelos animais mais usados para o estudo da obesidade e da diabetes tipo 2. Estes animais possuem grandes ilhotas pancreáticas (com volume dez vezes maior que do animal normal) com alta produção de insulina pelas células β (GEPTS *et al.*, 1960; WESTMAN, 1968). Adicionalmente os animais apresentam infertilidade e deficiência na função imune.

Os camundongos *ob/ob* são indistinguíveis de seus irmãos normais até a segunda semana de idade, quando começam a ficar mais pesados e a desenvolver hiperinsulinemia. Estas diferenças ficam muito mais acentuadas na quarta semana quando começam a desenvolver hiperglicemia. A glicose sérica continua aumentando até o terceiro ao quinto mês de idade, ao mesmo tempo em que os animais apresentam uma ingestão alimentar muito aumentada e com

rápido ganho de peso (WESTMAN, 1968; EDVELL e LINDSTROM, 1995; 1999). Depois disso, os níveis de glicose vão reduzindo podendo chegar próximo ao normal nos animais mais velhos. Os animais continuam muito resistentes à insulina, mas a tolerância à glicose aumenta quando nos animais acima de 20 semanas (WESTMAN, 1968; HERBERG *et al.*, 1970).

O aumento do tamanho das ilhotas pancreáticas nestes animais não parece estar ligado somente a uma alteração direta no pâncreas, mas sim a uma resposta das células β à demanda aumentada de insulina. As ilhotas respondem bem a estímulos liberadores e inibidores na maioria das condições experimentais. As células β das ilhotas possuem receptores para a leptina, a qual inibe a secreção de insulina na maioria dos estudos, explicando algumas diferenças funcionais das ilhotas do *ob/ob* e seus controles (EMILSSON *et al.*, 1997).

Os níveis de glucagon são altos nos *ob/ob* (DUBUC *et al.*, 1977). A secreção aumentada de glucagon é um importante fator nas alterações metabólicas do *ob/ob*. A imuno-neutralização do glucagon nos *ob/ob* melhora o seu metabolismo (SORENSEN *et al.*, 2006). O glucagon aumenta a liberação de glicose para o sangue pelo fígado e há uma correlação entre esta liberação e os níveis glicêmicos em pacientes com diabetes tipo 2 (GASTALDELLI *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que a redução do glucagon sérico pode ser um alvo importante no tratamento de diabetes.

As características mais óbvias nos *ob/ob* são o grande ganho de peso e a alta ingestão de alimentos. Além disso, eles apresentam distúrbios de termoregulação e baixa atividade física espontânea. A ingestão alimentar aumentada nestes animais é resultante principalmente do aumento da liberação do neuropeptídeo Y no hipotálamo e da diminuição da liberação de sinais anorexígenos. Outros sistemas regulatórios, entretanto, devem estar envolvidos no aumento do apetite nos *ob/ob*, como a insulina, a dopamina e a serotonina. A insulina é bem conhecida como reguladora de apetite, embora isso não tenha sido muito estudado nos *ob/ob* (PLUM *et al.*, 2006; PRODI e OBICI, 2006). A dopamina reduz a ingestão alimentar e melhora o metabolismo dos *ob/ob* (BINA e CINCOTTA, 2000). A serotonina produz efeito semelhante (THRYBOM *et al.*,

2001). Outras substâncias também alteram a ingestão dos *ob/ob* como: drogas anti-epiléticas (LALONDE *et al.*, 2004), agonistas do receptor canabinóide (ZHOU e SHEARMAN, 2004), ativadores de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (EDVARDSSON *et al.*, 2003), endotoxin (FAGGIONI *et al.*, 1997) e hormônios da tireóide (DUBUC, 1991).

Os camundongos deficientes para leptina têm baixa temperatura corpórea quando comparados aos controles magros e reduzida resposta termogênica ao frio (TRAYHURN e JAMES, 1978). Este fato pode estar relacionado com altos níveis de NPY o qual inibe a termogênese no tecido adiposo marrom (BILLINGTON *et al.*, 1991). Existem ainda sinais de baixa termogênese tanto no tecido adiposo branco (TAB) quanto no tecido adiposo marrom (TAM) destes animais (HANSEN e KNUDSEN, 1982). A proteína desacopladora-1 (UCP-1) está diminuída tanto no TAB quanto no TAM nos *ob/ob*. PPAR α coativador-1 (PGC-1) que é importante na regulação da UCP-1 pelo estímulo do frio, está diminuída nos *ob/ob* e a leptina aumenta a expressão deste fator no TAB e no TAM, tanto *in vitro* como *in vivo* (KAKUMA *et al.*, 2000).

Entres outras alterações metabólicas dos *ob/ob* podemos destacar o efeito da resistência à insulina nos músculos. Estes animais possuem aumento de gordura intracelular no coração e no músculo esquelético (JOLLY *et al.*, 1978; GIACOMELLI e WIENER, 1979). O acúmulo de lipídeos intracelulares nos músculos pode contribuir para a RI, pois reduz a captação de glicose e a função mitocondrial (PETERSEN e SHULMAN, 2006; RATTARASARN, 2006). O principal transportador de glicose nos músculos e no TA é o GLUT-4, o qual tem sua translocação para a membrana celular regulada pela insulina. Este transportador está reduzido nos adipócitos dos *ob/ob* (GETTYS *et al.*, 1997), mas não nos músculos destes animais (BUSE *et al.*, 1997). Outra alteração importante é o fato da gliconeogênese hepática estar aumentada nos *ob/ob* (LOMBARDO e MENAHAN, 1979) o que deve contribuir para a hiperglicemia destes animais.

1.5 Transplante de tecido adiposo

Os camundongos deficientes para a leptina têm, entre outras características, uma marcante infertilidade. Esta é derivada principalmente da influência da leptina no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (CUNNINGHAM *et al.*, 1999) (GONZALEZ *et al.*, 2000). A falta da leptina sinaliza ao hipotálamo que não há reservas de energia na forma de tecido adiposo, portanto o animal não está apto a desenvolver suas funções reprodutivas. Desta forma os animais *ob/ob* apresentam hipogonadismo, sendo que as fêmeas se mantêm em anestro e os machos são incapazes de desenvolver a espermatogênese adequadamente. A fertilidade destes animais pode ser restaurada através da administração de leptina exógena (HARRIS *et al.*, 1998). A leptina é agonista dos receptores OB-rb presentes no núcleo arcado no hipotálamo promovendo a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual age na hipófise liberando os hormônios folículo estimulante e luteinizante (FSH e LH). Estes últimos são responsáveis pela ativação das gônadas e regulação da reprodução (FOSTER e NAGATANI, 1999; GONZALEZ *et al.*, 2000). A infertilidade destes animais dificulta sua criação, a qual vem sendo feita através do cruzamento de animais heterozigotos portadores da mutação *ob*. Estes animais são magros e férteis, mas o cruzamento de heterozigotos gera apenas um animal *ob/ob* a cada 4 filhotes produzidos. A manutenção e ampliação de maternidades mantidas neste esquema de cruzamento é cara e depende da genotipagem dos animais magros para verificar quais são os portadores da mutação *ob*. Portanto a restauração da fertilidade dos animais *ob/ob* é desejável para a manutenção das colônias. A administração de leptina exógena é extremamente cara sendo inviável como técnica de criação. O uso de outros fundos genéticos (“background”) pode restaurar parcialmente a fertilidade dos *ob/ob*, mas não é suficiente para a manutenção da colônia além de implicar em limitação do uso dos modelos animais conhecidos a estes “backgrounds” específicos (HALUZIK *et al.*, 2004). Uma alternativa para reversão do fenótipo infértil dos *ob/ob* é a terapia gênica.

Esta foi feita com sucesso, com o uso de vetor viral, mas é dispendiosa para ser mantida como rotina de um biotério (MUZZIN *et al.*, 1996). A melhor alternativa para a restauração da fertilidade destes animais é o transplante de tecido adiposo. Esta técnica é simples, barata e de fácil execução. Ela consiste no implante de pequenos fragmentos de tecido adiposo proveniente de animais magros, irmãos de mesma ninhada, na região subcutânea dos animais deficientes para leptina. Através deste procedimento os animais *ob/ob* perdem peso, restabelecem o metabolismo glicêmico normal e tornam-se férteis (KLEBANOV *et al.*, 2005). Neste trabalho nós simplificamos a técnica cirúrgica do transplante de TA e mostramos que a reversão da fertilidade é estável e duradoura. Desta forma, pode ser usada para a criação destes animais e para facilitar a geração de animais transgênicos derivados dos *ob/ob*.

1.6 Sistema Calicreína-cininas

O sistema calicreína-cininas (SCC) está envolvido em muitos processos biológicos, dentre os quais os mecanismos de resposta inflamatória (BHOOLA *et al.*, 1992), nocicepção e transmissão de dor (DRAY e PERKINS, 1993), controle da pressão arterial (SCHOLKENS, 1996), fluxo local de sangue, transporte de eletrólitos e glicose, e proliferação celular (BHOOLA *et al.*, 1992), atuando também no trato gastrointestinal (NSA ALLOGHO *et al.*, 1998). Além disso, está presente no processo de captação de glicose por células musculares e adipócitos por meio da translocação do principal carreador de glicose nessas células (GLUT4) para sua membrana citoplasmática. Esta translocação está direta ou indiretamente facilitada pela ação da bradicinina sobre os receptores B2 de cininas (KISHI *et al.*, 1998).

De um modo geral, esse sistema é composto por: a) substratos glicoprotéicos precursores (cininogênios), envolvidos na cascata de coagulação e inflamação; b) enzimas proteolíticas da família das serino-proteases (calicreínas tecidual e plasmática), presentes em células glandulares, neutrófilos e fluidos

biológicos; c) peptídeos vasoativos (cininas), provenientes da hidrólise dos cininogênios pelas calicreínas; d) dois receptores transmembrânicos específicos (B1 e B2), acoplados à proteína G (REGOLI *et al.*, 1990; BHOOLA *et al.*, 1992); e) enzimas que promovem rapidamente o catabolismo das cininas (cininases), de 10 a 50 segundos após sua formação, liberando os agonistas do receptor B1 ou peptídeos inativos.

Este sistema está representado de forma esquemática na figura 1.

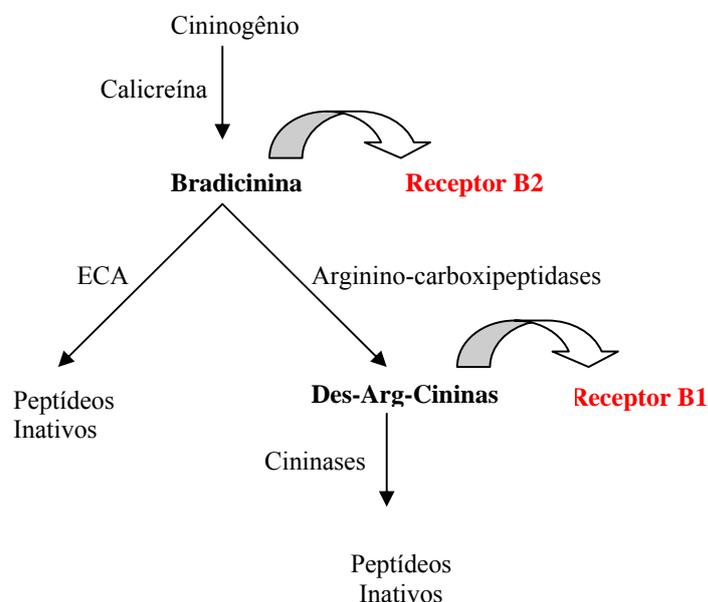


Figura 1: Representação esquemática do sistema calicreína-cininas.

A ação das calicreínas tecidual e plasmática em humanos libera os peptídeos vasoativos calidina (Lys-BK) e bradicinina (BK), respectivamente. O primeiro, gerado pela ação sobre o cininogênio de baixo peso molecular; e o segundo, sobre o cininogênio de alto peso molecular (BHOOLA *et al.*, 1992).

As carboxipeptidases N e M, em especial, têm grande importância no SCC por clivarem a arginina C-terminal da Lys-BK e BK (agonistas do receptor

B2) gerando assim os agonistas do receptor B1, des-Arg¹⁰-calidina e des-Arg⁹-BK respectivamente. O metabolismo destas cininas geradas é diferente das primeiras nos seguintes aspectos: as des-Arg-cininas não sofrem a ação das arginino-carboxipeptidases, a enzima conversor de angiotensina (ECA) tem afinidade muito menor por elas, e a posição Phe⁸ na porção C-terminal parece protegê-las da degradação por neprilisina (MARCEAU *et al.*, 1998). A figura 2 apresenta um esquema com os pontos de clivagem da bradicinina.

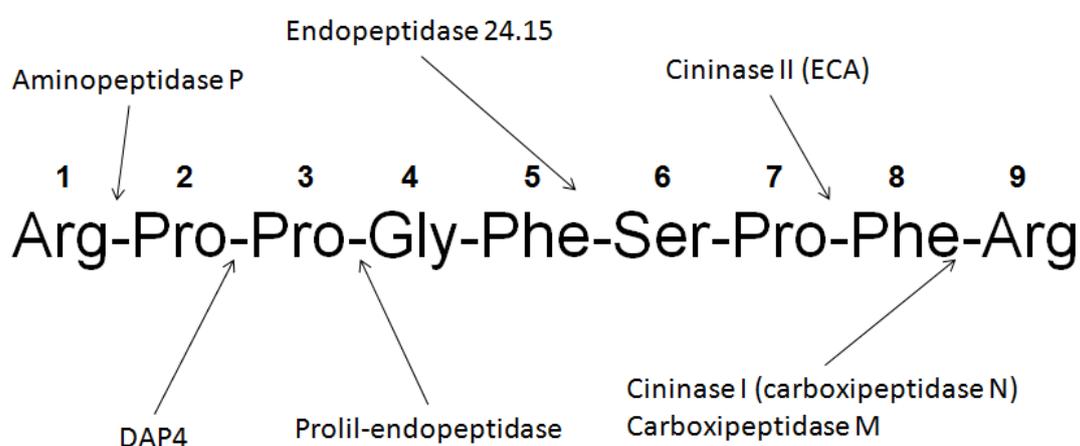


Figura 2: Processamento Proteolítico das cininas. Algumas das enzimas envolvidas no metabolismo da bradicinina e seus pontos de clivagem. ECA, enzima conversora de angiotensina.

As cininas agem basicamente por ativação dos receptores B1 e B2. O subtipo B2 é constitutivamente expresso, mostrando-se envolvido principalmente no controle da pressão arterial, mediando resposta vasodilatadora periféricamente, e vasoconstritora em ventrículos cerebrais (LINDSEY *et al.*, 1988), também regulando a excreção de sais e água do organismo (MUKAI *et al.*,

1996). Em 2001 foi mostrado o aumento da expressão do receptor B2 de bradicinina nas células musculares lisas vasculares em hiperglicemia diabética (CHRISTOPHER *et al.*, 2001). A glicose induz a ativação de proteína quinase C, que seria mediadora da regulação positiva desses receptores, talvez podendo explicar as alterações vasculares típicas em diabetes.

O receptor B1, descrito inicialmente em musculatura lisa e fibroblastos de várias espécies, apresenta-se pouco expresso em condições normais, porém sua expressão é ativada em respostas inflamatórias (BHOOLA *et al.*, 1992). Este subtipo é expresso constitutivamente no músculo liso do trato gastrointestinal (BHOOLA *et al.*, 1992; PESQUERO *et al.*, 2000) e no endotélio de alguns vasos sanguíneos (BURCH e KYLE, 1992).

Os mecanismos de segundos mensageiros envolvidos na ativação dos receptores B1 e B2 de cininas vêm sendo também amplamente estudados, devido a sua possível ligação com muitos dos efeitos metabólicos mediados por eles. Sabe-se que ambos os receptores têm a capacidade de induzir aumento de cálcio intracelular em músculo liso (MATHIS *et al.*, 1996), podendo estar envolvidos na liberação de óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina via cálcio-dependente (MARCEAU, 1995). Destaca-se o papel do NO liberado pela ativação dos receptores de cininas em muitos processos, como no controle da contratilidade vascular (THIEMERMANN, 1997), hipertensão e contratilidade cardíaca (MONCADA *et al.*, 1991), reações imunológicas e agregação de plaquetas (THIEMERMANN, 1997), inflamação, processos infecciosos, e regulação da ingestão alimentar e esvaziamento gástrico em modelo animal de obesidade (MORLEY e FLOOD, 1991).

Nosso grupo mostrou que a deficiência do receptor B1 de cininas, nos vasos pancreáticos, induziu a uma menor produção de insulina no pâncreas dos camundongos nocaute para o receptor B1, o que traduziu em uma hiperglicemia (ARAUJO *et al.*, 2006). Levando em consideração que esses e outros experimentos realizados em nosso laboratório sugeriram importante ligação dos receptores de cininas com o controle do metabolismo energético, pretendemos estabelecer a relação do sistema caliceína-cininas na obesidade mórbida.

1.6.1 Camundongos Nocaute para os Receptores de Cininas

1.6.1.1 Camundongo deficiente para o receptor B2

Vários artigos vêm caracterizando os efeitos fisiopatológicos do receptor B2 através de ensaios farmacológicos (BHOOLA *et al.*, 1992). Com a geração do camundongo deficiente para o receptor B2 de cinina (BORKOWSKI *et al.*, 1995), uma nova ferramenta foi adicionada para a avaliação do impacto desse receptor em eventos fisiológicos. Esse animal apresentou-se fértil e a pressão arterial é ainda motivo de controvérsias. Em 1997, mostrou-se que a deficiência do receptor B2 de cininas foi capaz de gerar um quadro hipertensivo (MADEDDU *et al.*, 1997), entretanto em 2001 mostrou-se que não há diferença significativa na pressão arterial dos camundongos B2 nocaute (MILIA *et al.*, 2001). Essa discrepância provavelmente deve-se ao tipo de linhagem utilizada. Todavia os animais B2-/- apresentaram um aumento da pressão arterial quando submetidos à alta ingestão de sal (ALFIE *et al.*, 1997).

O camundongo deficiente para o receptor B2 de cinina é hiperglicêmico e apresenta resistência a insulina quando comparado com os animais selvagens (DUKA *et al.*, 2001). Esse dado corrobora os resultados farmacológicos que mostraram que a ativação do receptor B2 é capaz de induzir a captação de glicose (BHOOLA *et al.*, 1992).

Além disso, esse animal deficiente para o receptor B2 de cininas apresenta hipertrofia cardíaca, especialmente do ventrículo esquerdo, o que mostra que o receptor B2 está envolvido no crescimento e remodelação cardíaca (EMANUELI *et al.*, 1999). Nosso grupo mostrou que o coração do nocaute para o receptor B2 não é capaz de produzir uma hipertrofia fisiológica quando estimulada pela natação (CARNEIRO *et al.*, 2008).

Como descrito acima, o receptor B2 está envolvido no controle da pressão arterial, homeostasia da glicose, crescimento, remodelação cardíaca, além de ser importante na excreção de sal (BHOOLA *et al.*, 1992), contudo o seu papel na

patogenia da obesidade mórbida e na síndrome metabólica ainda não foi esclarecido totalmente. Todavia, uma recente publicação mostra que a expressão dos receptores B1 e B2 de cininas está modificada em vários tecidos importantes para o gasto energético e ingestão alimentar dos camundongos *ob/ob* (ABE *et al.*, 2007). Os resultados encontrados por esses pesquisadores mostram interessantes perspectivas para o estudo desses receptores, no modelo de obesidade proposto nesse trabalho.

1.6.1.2 Camundongo deficiente para o receptor B1

O camundongo nocaute para receptor B1 de cininas foi gerado, por pesquisadores da UNIFESP e da Alemanha (PESQUERO *et al.*, 2000). Esses animais não apresentaram nenhuma disfunção reprodutiva, sendo sadios e férteis. Não foram observadas disfunções cardiovasculares nos nocautes B1 sendo esses animais normotensos sem presença de lesões cardíacas ou diferenças nos batimentos cardíacos. Apesar deste quadro, os animais nocautes mostraram ser resistentes a hipotensão mediada pelo lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas (LPS).

Outro estudo foi realizado utilizando os camundongos nocaute do B1 para verificar o papel desse receptor em processos inflamatórios. Para tanto, uma peritonite foi induzida, sendo observada uma menor migração de neutrófilos para os focos de inflamação nos animais nocaute B1 e um menor índice de apoptose espontânea nos neutrófilos desses animais (ARAUJO *et al.*, 2001).

Mostramos ainda, que a deficiência do receptor B1 de cininas, nos vasos pancreáticos pode ser responsável pela menor produção de insulina no pâncreas dos camundongos nocaute para o receptor B1, o que traduziu em hiperglicemia após ingestão de alimentos (ARAUJO *et al.*, 2006).

Recentemente o grupo alemão coordenado pelo Dr. Michael Bader gerou os animais duplo-nocaute para os receptores B1 e B2 de cininas. Os animais não apresentaram obvias anomalias, hipertensão ou infertilidade. Entretanto eles são

resistentes a hipotensão induzida pelo LPS, como observado também para os nocaute B1 (CAYLA *et al.*, 2007).

Anteriormente a este trabalho, nosso grupo gerou o animal deficiente tanto para a leptina como para o receptor B1 de cininas (*ob/obB1^{-/-}*). Este animal foi importante para elucidar a relação entre os receptores B1 e a sensibilidade à leptina, mostrando que os efeitos protetores para a obesidade gerada por dieta hiperlipídica, descritos nos animais B1^{-/-}, se tornavam nulos na ausência de leptina, e que os animais *ob/obB1^{-/-}* eram mais sensíveis a administração de leptina exógena do que seus controles *ob/ob* (MORI *et al.*, 2008).

Diante da importância das cininas na homeostase da glicose e, portanto, no estudo da obesidade, resolvemos gerar os animais *ob/obB2^{-/-}* e *ob/obB1B2^{-/-}* e verificar as alterações relacionadas à homeostase da glicose. Para isso utilizamos o transplante de tecido adiposo para reverter a infertilidade dos animais *ob/ob* e gerar os novos modelos biológicos de maneira mais racional, econômica e com o uso de menos animais no esquema de cruzamento.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

A partir do conhecimento prévio das características fenotípicas e de alguns parâmetros bioquímicos e hormonais dos camundongos nocaute para os receptores B1 e B2 de cininas e dos nocautes naturais para a leptina (*ob/ob*), foram gerados dois novos modelos biológicos: o camundongo nocaute tanto para o receptor B2 de cininas quanto para a leptina (*ob/obB2^{-/-}*), e o camundongo nocaute para os receptores B1 e B2 de cininas assim como para a leptina (*ob/obB1B2^{-/-}*). A criação destes modelos visa gerar novas ferramentas para investigar e estabelecer a correlação funcional entre a sinalização metabólica dos receptores de cininas, seus mediadores e segundos mensageiros, e a leptina, assim como os possíveis mecanismos envolvidos no processo de metabolismo energético e desenvolvimento de obesidade.

2.2 Objetivos específicos

Padronizar um método para geração de animais transgênicos *ob/ob* através do transplante de tecido adiposo.

Investigar como o implante é capaz de reverter a infertilidade dos animais *ob/ob*.

Gerar os camundongos *ob/ob* deficientes para os receptores B2 de cininas e deficientes para ambos receptores de cininas (B1 e B2).

Caracterizar os camundongos gerados através da aferição de:

Crescimento e ganho de peso;

Massa de diversos órgãos;

Glicemia, insulinemia e captação da glicose;

Relação entre massa do tecido adiposo abdominal e subcutâneo

3 Material e Método

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) deficientes para os receptores B1 e B2 de cininas (B2^{-/-} e B1B2^{-/-}), e os animais deficientes para leptina (*ob/ob*), de aproximadamente 3 meses de idade, foram obtidos no Departamento de Biofísica (UNIFESP/EPM) mediante colaboração com o Prof. Dr. João Bosco Pesquero e Dr. Michael Bader (MDC-Berlim). Estes animais foram usados para cruzamento a fim de gerar os modelos experimentais deficientes para leptina e para os receptores de cininas (*ob/ob*B2^{-/-} e *ob/ob*B1B2^{-/-}). Os animais foram mantidos em biotério com mantidos no Laboratório de Experimentação Animal – INFAR em microisoladores ventilados água e ração Nuvital CR-1 *ad libitum*, autoclavados. Temperatura da sala de 21±2°C e ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Os animais apresentam microbiologia negativa (bactérias e fungos) para os agentes prevalentes segundo a relação sugerida pela FELASA (Federação Européia da Ciência de Animais de Laboratório). Todos os experimentos com os animais são conduzidos em conformidade com os Comitês de Ética da UMC e UNIFESP; e com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (CEMEA/UMC 015/05 e 02/08).

3.2 Transplante de Tecido Adiposo Branco

O transplante de tecido adiposo foi usado com dois objetivos: a) criar animais *ob/ob* férteis para realização dos cruzamentos com os animais nocaute para receptores de cininas; b) experimentar a sensibilidade dos animais *ob/ob* ao transplante de tecido em diferentes idades.

Para a geração de animais férteis foi realizado transplante de tecido adiposo inguinal (TAI) proveniente de irmãos magros de mesma ninhada e de

mesmo gênero. Estes animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o TAI retirado em condições estéreis e colocado em solução salina tamponada (PBS). Os animais *ob/ob* receptores foram anestesiados com xilazina e a ketamina nas doses de 10 e 150 mg por kg, respectivamente. Foram implantados 1000 mg de tecido em cada animal, divididos em 8 fragmentos de 100 a 150 mg, inseridos no subcutâneo através de duas pequenas incisões (5 mm) com sentido crânio caudal, seguindo a linha média dorsal, sendo uma sobre o tórax e outra sobre a região lombar. A solução de continuidade da pele foi reduzida com pontos simples feitos com fio cirúrgico de polipropileno número 4-0. Após cirurgia, foi administrado antibiótico (benzilpenicilina, 100.000UI/kg) e antiinflamatório (Butorphanol 5 mg / kg a cada 6 h), via subcutânea, para evitar infecção pós-cirúrgica e reduzir o desconforto dos animais. Os animais foram monitorados diariamente e o acompanhamento da variação da massa corporal foi realizado semanalmente. Após três semanas de recuperação os animais foram colocados com fêmeas magras nocautes para os receptores de cininas.

Para avaliar a sensibilidade dos animais ao transplante de TA, camundongos fêmeas *ob/ob*, de diferentes idades, foram divididas em três grupos: 1- animais com menos de 2 meses e massa corpórea em torno de 16 g (abaixo do peso de um animal adulto normal); 2- animais com 2,5 meses e massa corpórea em torno de 28g (massa semelhante à de um animal adulto normal); 3- animais com mais de três meses e massa corpórea acima de 40 g (adultos obesos). Estes três grupos receberam 300mg de tecido adiposo proveniente de doadores magros. Para o controle das alterações que poderiam ser causadas por outros fatores ligados ao transplante, foi operado o grupo chamado sham, cujos animais *ob/ob* receberam implantes de tecido proveniente de animais *ob/ob*. Os camundongos foram anestesiados, conforme protocolo acima descrito, e receberam dois implantes subcutâneos de 150 mg de TAI, retirados de doadoras magras irmãs de mesma ninhada. Os animais foram medicados com antibióticos e antiinflamatórios durante a primeira semana. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 10, 60 e 150 após a cirurgia.

3.3 Curva de crescimento padrão

Para comparar as alterações causadas no ganho de peso dos animais *ob/ob* transplantados, um outro grupo de animais de mesmo genótipo, parentes de linhagem, foi mantido nas mesmas condições experimentais de temperatura, umidade, alimentação e ingestão de água, a fim de se obter uma curva de crescimento (ganho de peso) padrão. Para isso, estes animais tiveram suas massas aferidas semanalmente até completarem 20 semanas de idade. Outra curva foi feita para os animais que sofreram a cirurgia controle (grupo sham operado), onde os animais passaram pelos mesmos procedimentos dos grupos experimentais, mas receberam implantes de tecido adiposo provenientes de camundongos também deficientes para a leptina.

3.4 Mensuração de leptina e insulina sérica

Foram coletadas amostras de sangue dos animais transplantados nos tempos 0, 10, 60 dias após o transplante. Os soros das amostras foram separados por centrifugação e armazenados a – 20° C. Leptina e insulina séricas foram mensuradas através de ELISA (Mouse Leptin Immunassay, Quantikine, R&D Systems, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, United states of América; e RAT/MOUSE INSULINE ELISA KIT, LINCO Research, 6 Research Park Dr, St. Charles, Missouri 63304, USA).

3.5 Análise histológica

Os tecidos implantados foram removidos cirurgicamente e processados pela Histotec, São Paulo, Brasil. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e analisadas em microscópio óptico.

3.6 Genotipagem

3.6.1 Genotipagem do gene *OB*

Para a extração do material genético foi retirado um pequeno fragmento da extremidade da cauda (~2 mm) de cada animal. Para a digestão da amostra tecidual foram adicionados 700 μ L de *tampão de cauda* e 35 μ L de proteinase K (10 mg/mL) a cada amostra, as quais foram incubadas sob agitação constante de 850 rpm e temperatura de 55°C, por aproximadamente 15 horas. Após a total digestão, as amostras foram colocadas em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 300 μ L de solução de NaCl saturado (6 M), feita a homogeneização manual e centrifugação a 4°C, 10.000 g, por 20 min. O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante foi transferido para um tubo de polietileno de 2 mL e incubado com 5 μ L de RNase (4mg/mL) a 37°C, por 15 minutos. Adicionou-se 1 mL de isopropanol 100% e homogeneizou-se lentamente por inversão, submetendo-se a amostra à centrifugação a 4°C, 10.000 g, por 30 min. O sobrenadante foi rejeitado e ao precipitado lavado com 500 μ L de etanol 70%. Após nova centrifugação o precipitado foi seco a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e depois suspenso em 30 μ L de solução Tris/EDTA, pH 8,0 (T.E). A concentração das amostras foi dosada em espectrofotômetro, e estas acondicionadas a -20°C.

Para identificação de da mutação no gene da leptina, um fragmento de DNA do gene foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Os iniciadores utilizados foram: OBS (sense): 5' CCC TGC TCC AGC AGC TGC 3' e OBAS (antisense): 5' CAT GAT TCT TGG GAG CCT GG 3'. A reação foi realizada em termociclador seguindo o seguinte protocolo:

Solução de reação:

1,0 µg de DNA amostral;
5,0 µL de Tampão de PCR (10x);
2,5 µL de MgCl₂ (50 mM);
2,0 µL de dNTPs (10 mM);
1,0 µL de iniciador OBS (50 ng/µL);
1,0 µL de iniciador OBAS (50 ng/µL);
0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL);
H₂O *milli-Q* autoclavada qsp 50µL.

Programa para termociclador:

Passo 1 - 94°C por 4 minutos;
Passo 2 - 80°C por 5 s;
Passo 3 - 94°C por 50 s;
Passo 4 - 56°C por 50 s;
Passo 5 - 72°C por 1min e 20 s;
Passo 6 - Voltar ao “Passo 3” 40 vezes;
Passo 7 - 72°C por 7 min.;
Passo 8 - 16°C - ∞.

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 3%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A banda esperada era de 355 pares de bases. Após a verificação da integridade do DNA, o produto da PCR foi submetido à diálise sobre pequenas membranas em água *milli-Q* autoclavada, visando eliminar parte dos reagentes utilizados na reação. Após a diálise, essas amostras foram digeridas pela enzima *Ddel* a 37°C por 12 horas, sendo utilizados, aproximadamente, 3,5 µg do DNA dialisado, 2,0 µL de tampão REACT 3 (10X), 1,0 µL de *Ddel* (3,5 U/µL) e água *milli-Q* autoclavada, para um volume final de 20

μ L. Após análise por eletroforese, nas mesmas condições anteriores, a mutação no gene *OB* foi identificada pela presença de uma banda de 103 pares de bases. A diferenciação entre os heterozigotos e os homozigotos foi feita pela observação do fenótipo obeso.

3.6.2 Genotipagem do gene dos receptores de cininas:

A genotipagem para o receptor B1 e B2 e cassetes de neomicina de animais nocaute B2KO ou B1B2KO, foi realizada por PCR com iniciadores específicos para descritos na tabela 1:

Tabela 1: Iniciadores usados para a genotipagem dos receptores de cininas e seus respectivos cassetes de neomicina.

Fragmento de DNA	Nome dos iniciadores	Seqüência
Receptor B1 de Cininas	<i>BK135(7)</i> (sense)	5' CGG AAG CCT GGG ATC TGC TG 3'
	<i>BK135(3)</i> (antisense)	5' CCA GCA ACC TGT AGC GGT CC 3'
Cassete de Neomicina	BK1ES2 (sense)	5' GGA AGC CAT CAC TCA ACA TCC 3'
	NEO1L (antisense)	5' CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATG3'
Receptor B2 de Cininas	OIMR 434 (sense)	5' TGC CCT CAG CGT GTT CTT CC 3'
	OIMR 435 (antisense)	5' GGT CCT GAA CAC CAA CAT GG 3'
Cassete de Neomicina	OIMR13Neo (sense)	5' CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC 3'
	OIMR14 Neo (antisense)	5' AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC 3'

A PCR para a genotipagem dos receptores de cininas e seus respectivos cassetes de neomicina foi realizada com o seguinte protocolo:

Solução de reação:

0,4 μg do DNA amostral;
5,0 μL de Tampão de PCR (10x);
2,5 μL de MgCl_2 (50 mM);
2,0 μL de dNTPs (10 mM);
1,0 μL de iniciador sense (50 ng/ μL);
1,0 μL de iniciador antisense (50 ng/ μL);
0,5 μL de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μL);
 H_2O *milli-Q* autoclavada qsp 50 μL .

Programa para Termociclador:

Passo 1 - 94°C por 5 min. ;
Passo 2 - 94°C por 20 s;
Passo 3 - 56°C por 20 s;
Passo 4 - 72°C por 1min e 20 s;
Passo 5 - Voltar ao “passo 2” - 35 vezes;
Passo 6 - 72°C por 7 min.;
Passo 7 - 16°C - ∞ .

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A banda observada relativa ao receptor B1 e B2 de cininas foi de aproximadamente 320 e 290 pares de bases (pb) respectivamente, e referente aos cassetes de neomicina contendo uma seqüência da região 5' do receptor B1e B2, de aproximadamente 1300 e 300 pb,

respectivamente. Os animais selvagens (WT) apresentaram somente a banda específica do receptor B1 e B2; os nocautes (B1^{-/-} e B2^{-/-}), somente a banda dos cassetes de neomicina; e os heterozigotos (B1^{+/-} e B2^{+/-}), apresentaram ambas as bandas.

Os duplo-nocautes (B1B2^{-/-}) apresentaram somente as bandas dos cassetes de neomicina e não houve amplificação dos receptores B1 e B2 de cininas a partir do DNA genômico.

3.7 Análise de contração de músculo liso de estômago (Análise fenotípica)

Para verificar a ausência dos receptores de cininas nos tecidos dos animais foram realizados testes farmacológicos no estômago isolado dos animais *ob/obB2^{-/-}* e *ob/obB1B2^{-/-}*. Os animais foram sacrificados e tiveram seu sangue escorrido. A cavidade abdominal foi exposta e o estômago removido para utilização nos ensaios. Após lavagem em solução de Krebs, duas fatias musculares longitudinais (2-3mm de largura e 15-20 mm de comprimento) foram montadas em banhos individuais de 5mL contendo solução de Krebs, pH 7,4 à 37° C, continuamente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os fragmentos de tecido foram então esticados com uma tensão resistiva de 0,5 g. Após um período para equilibrar o sistema de 90 minutos, as preparações foram estimuladas e as contrações isométricas foram registradas e mensuradas por um transdutor de força (F-60 force-transducer; Narco Biosystem, Houston, TX) acoplado a um gravador potenciométrico (RB- 102, ECB, São Paulo). Os agonistas foram aplicados em concentração suficiente para ativação máxima de seus receptores por 90 segundos, seguido de lavagem e intervalos de 20 minutos. As respostas a bradicinina e Des-arg-bradicinina foram expressas como porcentagens da contração induzida por 1 mM de carbacol (CCh)

3.8 Desenvolvimento corporal dos animais *ob/obB2-/-*, *ob/obB1B2-/-* e controles.

Com o objetivo de investigar modificações do desenvolvimento e crescimento dos modelos experimentais gerados, a partir do desmame, aos 28 dias do nascimento, os filhotes foram acompanhados e suas massas mensuradas semanalmente até alcançarem a idade de 20 semanas.

3.9 Glicemia, curva glicêmica e teste de resistência a Insulina

A glicemia dos animais gerados e seus controles foi aferida em dois momentos: aos 90 e aos 180 dias de idade. Para isso foram realizados os testes de tolerância à glicose (TTG) e o teste de resistência à insulina (TRI). Para evitar alterações por estresse houve um intervalo de 7 dias entre os testes. Os níveis glicêmicos foram dosados nos animais privados de ração por 24 horas, através de uma gota retirada da ponta da cauda. Para a análise foi usado um glicosímetro (Accu-Chek Advantage). Para realização de curva glicêmica, foi injetado 1mg IP de glicose por grama de peso do animal. As dosagens foram realizadas no tempo 0, 30, 60, 120 e 180 minutos. Os mesmos tempos foram usados para a análise de resistência a insulina, onde os animais obesos são desafiados com uma dose de 20 UI de insulina por kg PV.

3.10 Coleta de órgãos

Após os testes glicêmicos, os animais foram sacrificados com aproximadamente 30 semanas de idade e tiveram alguns de seus órgãos coletados: fígado, baço, pâncreas, coração, tecido adiposo inguinal (TAI), tecido adiposo peri-renal (TAP), tecido adiposo subcutâneo (TASC) e músculo esquelético (tríceps sural). As massas dos órgãos foram mensuradas e amostras

foram conservadas em formol tamponado e congeladas em nitrogênio líquido para futuras análises.

3.11 Coleta de amostras de sangue e extração de soro

As amostras de sangue foram obtidas por punção retro-orbital utilizando-se pipetas tipo *Pasteur*. Após centrifugação a 1500 g por 10 min., o soro foi coletado e armazenado a – 20°C para realização dos testes bioquímicos e de ELISA.

3.12 Estatística

Os valores obtidos foram analisados com a utilização do programa GrafPad Prism. Os dados encontrados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão. Para análise estatística foi utilizado Teste *t* Student. Para análise de mais de duas amostras foi aplicado análise de variância (One Way ANOVA) seguida de verificação *post-hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas em nível de 95% onde os valores de *p* foram menores que 0,05.

4 Resultados

4.1 Genotipagem

Após coleta de um pequeno fragmento da cauda dos animais, digestão deste tecido e extração do material genético, reações de PCR foram realizadas para a amplificação de fragmentos dos genes dos receptores de cininas, dos cassetes de neomicina e do gene da leptina. O produto das reações foi analisado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Amostras destas análises estão representadas nas figuras 3,4 e 5. A figura 6 e a tabela 2 mostram, de forma esquemática, quais são as bandas esperadas após a digestão do produto da PCR do fragmento do gene *OB*.



Figura 3: Genotipagem para receptor B1 de cininas. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Marcadores de massa molecular: $\Phi\lambda$ Gibco (em ambas as imagens). A) Bandas de 320 pb relativa ao fragmento do receptor B1; B) bandas de 1300 pb referentes ao cassete de neomicina presente nos animais nocaute.

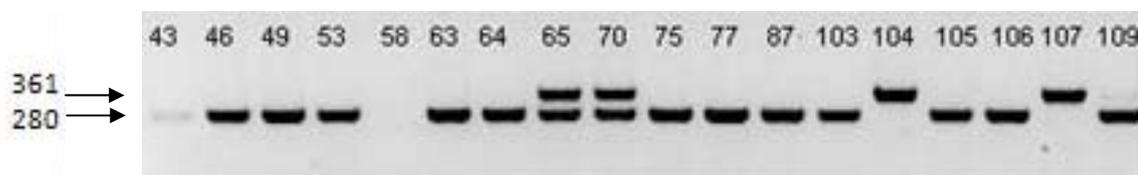


Figura 4: Genotipagem para o gene do receptor B2 de cininas. Uma PCR com quatro iniciadores foi realizada e seu produto analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Marcadores de massa molecular: $\Phi\lambda$ Gibco (esquerda). Os animais nocautes para o receptor de B2 de cininas apresentam apenas a banda de 280 pb relativa ao fragmento do cassete de neomicina; os animais heterozigotos apresentam as duas bandas e os animais controle apresentam apenas a banda de 361 pb relativa ao fragmento do receptor B2.

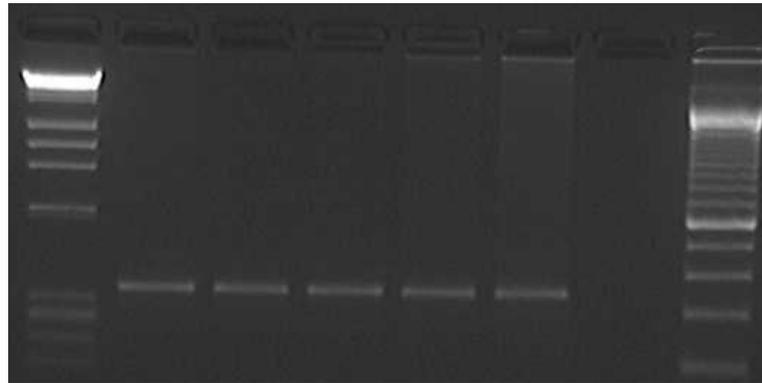


Figura 5: Eletroforese do produto do PCR para o gene da leptina. Gel de agarose 3%. Marcadores de massa molecular: $\Phi\lambda$ (esquerda) e 100 pb (direita). As bandas visualizadas ao centro possuem 355 pb.

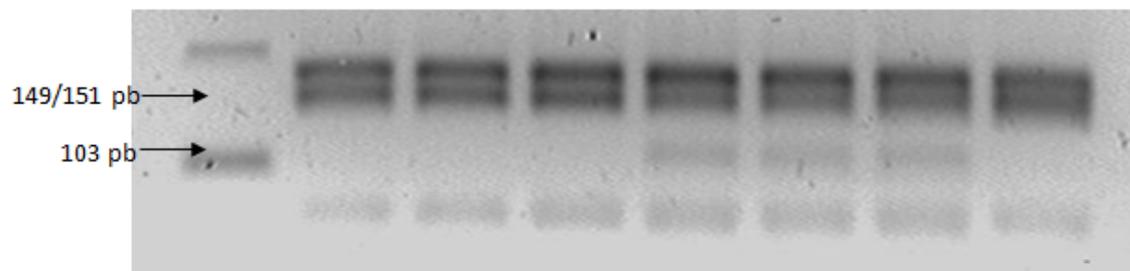


Figura 6: Eletroforese do produto da digestão do fragmento do gene da leptina. Gel de agarose 3%. Marcadores de massa molecular: $\Phi\lambda$ (esquerda) e A banda de 103 pb indica a presença de alelo com a mutação *ob*.

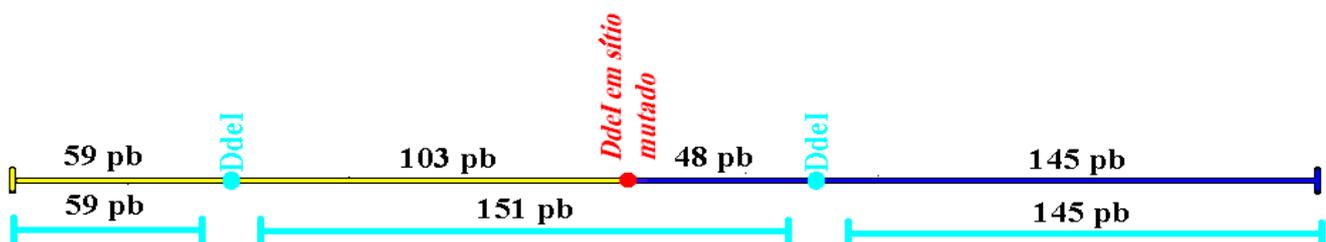


Figura 7: Posição dos locais de restrição da enzima *DdeI*. Esquema representando o fragmento de 355 pb amplificado do gene da leptina e os possíveis sítios de ligação da enzima *DdeI*: convencionais (azul) e mutado (vermelho).

Tabela 2: Fragmentos de DNA esperados na digestão do gene *ob*. Tamanho dos fragmentos esperados após digestão do produto de PCR do gene da leptina.

OB/OB	OB/ <i>ob</i>	<i>ob/ob</i>
59	59	59
145	145	145
151	151	/
/	103	103
/	48	48

4.2 Transplante de tecido adiposo

Para restaurar a fertilidade dos animais *ob/ob* e para verificar os efeitos do transplante de tecido adiposo no metabolismo destes animais, machos e fêmeas foram submetidos à cirurgia. Os animais receberam implantes de 300 mg de tecido adiposo proveniente de animais magros foram divididos em três grupos de acordo com suas idades.

Os animais de diferentes idades apresentaram diferentes perfis das curvas de crescimento após o transplante. Os animais muito jovens e abaixo do peso de um animal adulto magro normal continuaram a ganhar peso, devido provavelmente à continuidade do crescimento ósseo, atingindo uma média de massa corpórea semelhante à de animais magros normais de mesma linhagem (figura 8). O grupo de animais jovens com massa em torno de 28 g tendeu a manter este peso após o transplante. Já o grupo mais velho, que já apresentava obesidade e cujos integrantes apresentavam mais de 40 g no dia do transplante, mostrou um marcante emagrecimento após a cirurgia, mas sem atingir os valores de massa corpórea dos outros grupos. Apesar de estes animais continuarem com sobrepeso, suas massas se mantiveram muito menores do que aquelas aferidas na curva de crescimento padrão (figura 10).

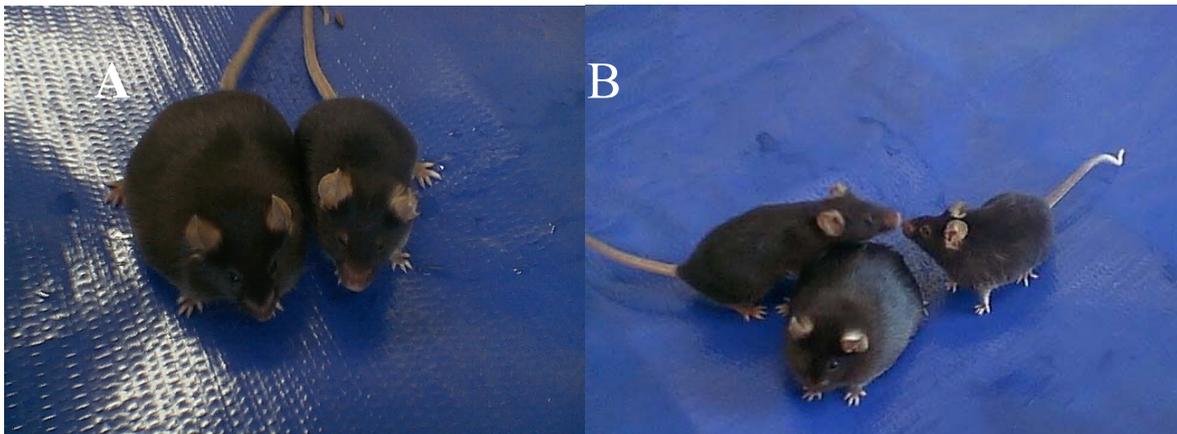


Figura 8: Fenótipo dos animais obesos (*ob/ob*), magros heterozigotos (*OB/ob*) e transplantados. A) Camundongo homozigoto *ob/ob* à esquerda e seu pai heterozigoto magro; B) Animal *ob/ob* transplantado se confunde com o heterozigoto magro.

Após 150 dias os animais foram anestesiados e tiveram seus implantes removidos (figura 9). Já na primeira semana após a cirurgia de remoção dos implantes, apesar do estresse cirúrgico e do anestésico, todos voltaram a engordar no mesmo ritmo que o mensurado na curva padrão de crescimento (figura 10).

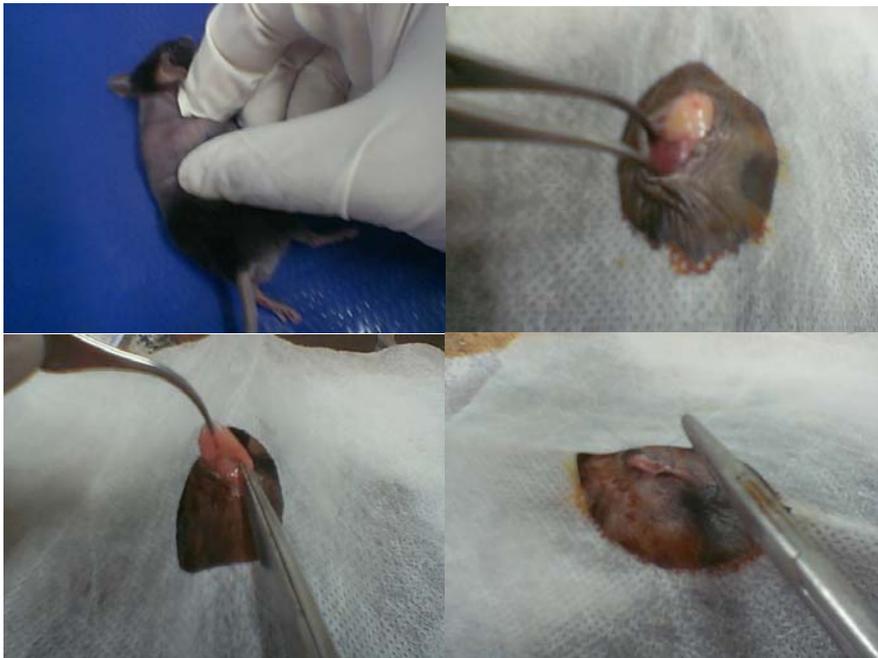


Figura 9: Localização, visualização e procedimento de remoção dos implantes subcutâneos de tecido adiposo. Para a remoção dos implantes é feita a tricotomia do campo cirúrgico, incisão da pele sobre o implante, remoção por divulsão e sutura simples.

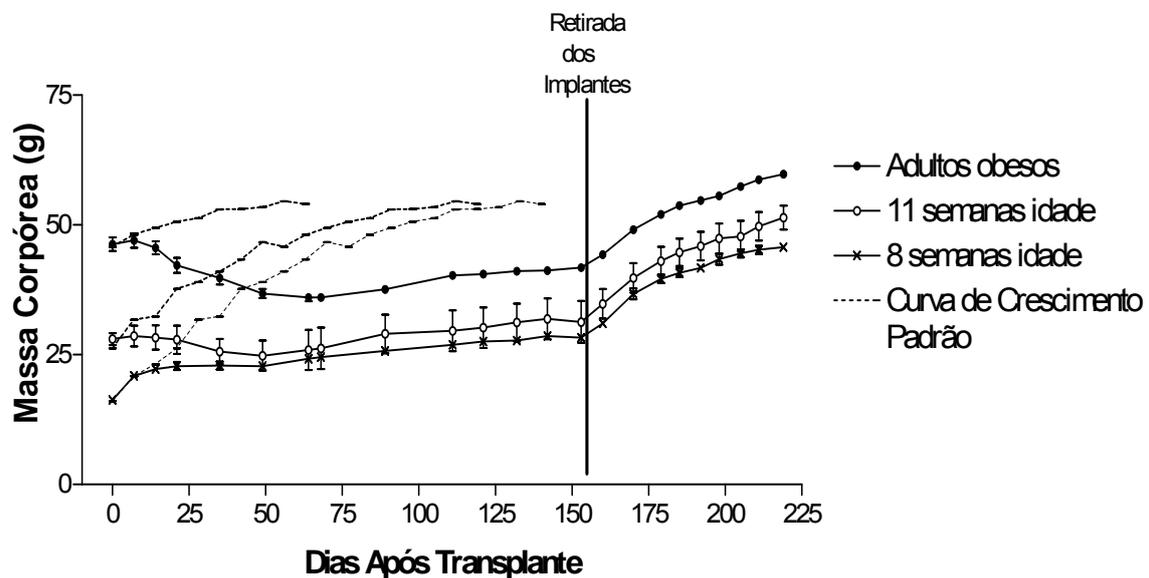


Figura 10: Alterações nas massas corpóreas dos camundongos *ob/ob* transplantados. Animais de diferentes idades após transplante de 300mg de tecido adiposo de doadores magros. As linhas pontilhadas indicam a curva de crescimento padrão para animais do mesmo genótipo não operados ($p < 0,01$ para todos os pontos a partir do 20º dia após transplante com relação à curva de crescimento padrão).

Após 10 dias que os animais receberam os transplantes os níveis de leptina no soro dos camundongos eram $0,255 \pm 0,059$ ng/ml (média \pm erro padrão). Foi aferida a leptina de um grupo de animais normais (WT) de mesma linhagem, cuja média de concentrações de leptina foi $2,994 + 0,345$ ng/ml. Como esperado os animais *ob/ob* não possuíam nenhuma leptina. Houve uma tendência de ligeiro aumento na leptina contida nas amostras coletadas no 60° e 150° dia após o transplante, entretanto não houve diferença significativa na análise estatística.

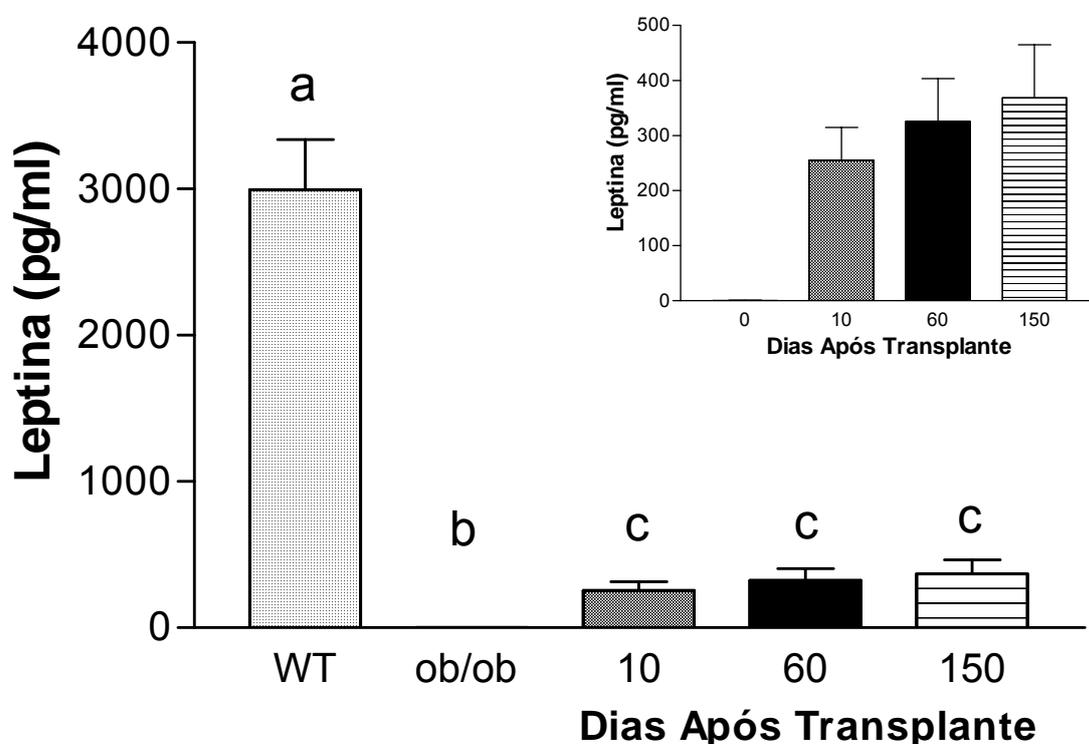


Figura 11: Níveis séricos de leptina nos animais transplantados com tecido adiposo. Leptina sérica de camundongos C57BL/6 normais (WT) e animais deficientes para leptina (*ob/ob*) antes e após implante subcutâneo de 300 mg de tecido adiposo proveniente de animais magros. $P < 0,001$ para “a” vs. “b” e “c”; $P < 0,05$ para “b” vs. “c”.

A reversão da marcante hiperinsulinemia dos animais *ob/ob* foi demonstrada pelos níveis de insulina, que reduziram drasticamente após 60 dias dos implantes alcançando níveis compatíveis a de animais normais (figura 12).

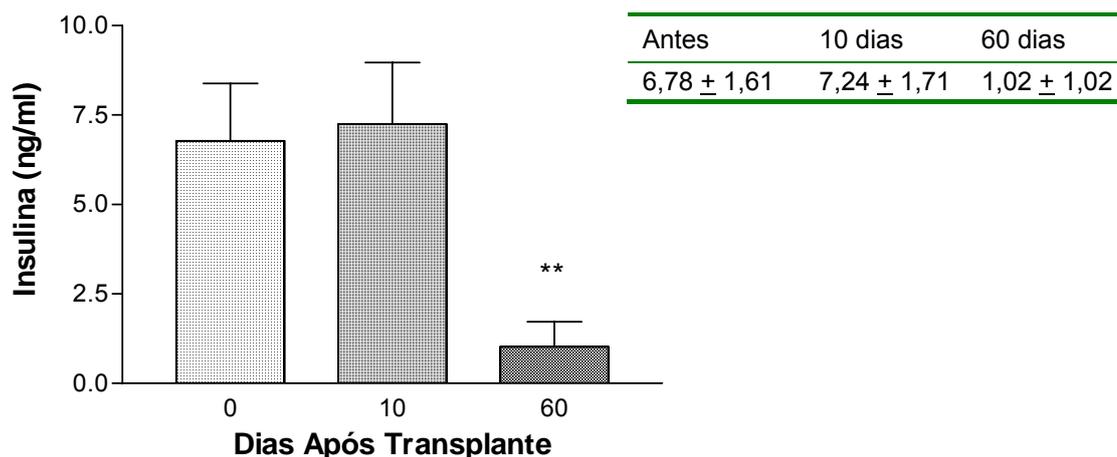


Figura 12: Níveis séricos de insulina dos animais *ob/ob* implantados. Resultado da aferição da insulina em animais transplantados com 300 mg de tecido adiposo de animais magros (** = $P < 0,01$, média \pm erro padrão).

Para melhor visualização de todas as alterações aferidas nos camundongos *ob/ob* após o transplante de 300 mg de tecido adiposo, os dados foram alinhados de maneira temporal e exibidos na figura 13. Nesta figura fica fácil visualizar que a diminuição da massa corpórea dos animais coincide com a diminuição da concentração de insulina no sangue e do aparecimento de leptina nas análises séricas.

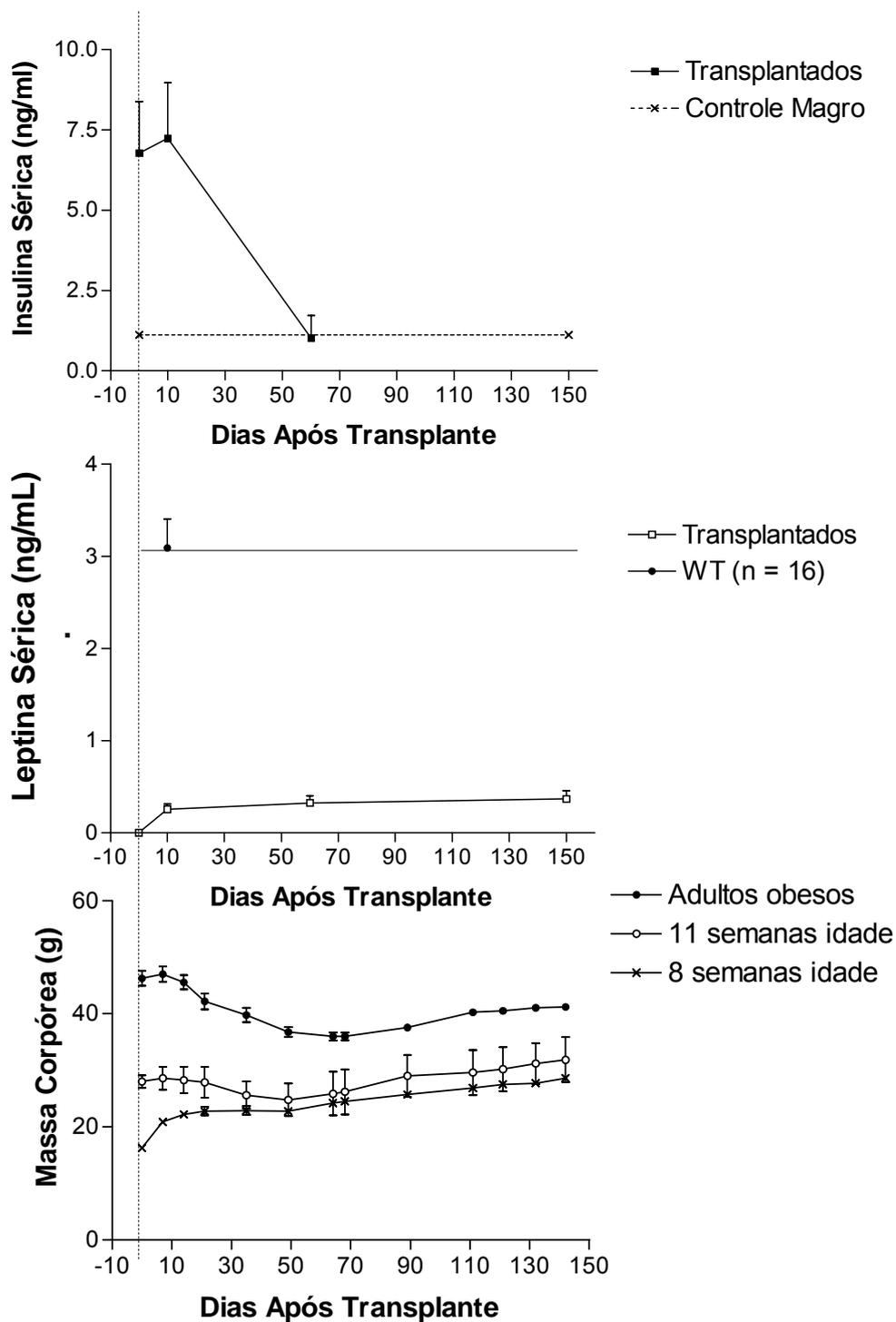


Figura 13: Comparação temporal entre os níveis séricos, de leptina e insulina, e alterações na massa corporal. Dados dos camundongos deficientes para leptina após o transplante de 300 mg de tecido adiposo proveniente de animais WT magros. A linha pontilhada indica o dia em que o transplante foi realizado.

Foram feitos dois diferentes grupos para controlar alterações geradas pelo estresse do procedimento cirúrgico e também reações adversas causadas pela presença de tecido homólogo implantado: o grupo sham operado, cujos animais receberam tecido adiposo de doadores *ob/ob*; e o grupo formado de animais *ob/ob* que não sofreram intervenções cirúrgicas, mas que foram mantidos nas mesmas condições dos animais operados (controle do crescimento padrão). O grupo sham operado teve uma pequena queda na massa corpórea na semana da intervenção cirúrgica, mas logo após voltou a ganhar peso acompanhando a curva de crescimento padrão (figura 14).

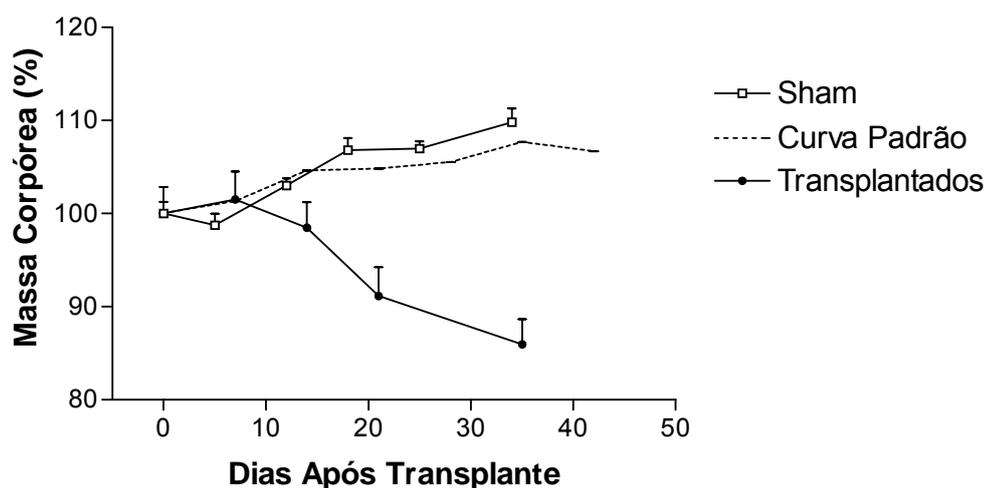


Figura 14: Controle da perda de massa corpórea após transplante. Comparação das alterações de massa corpórea entre o grupo experimental, o grupo sham operado e o grupo controle padrão. O grupo sham operado recebeu 300 mg de tecido adiposo proveniente de camundongos deficientes em leptina enquanto o grupo experimental recebeu implantes de animais magros de mesma ninhada. O grupo controle padrão não sofreu intervenções.

Os fragmentos do tecido implantado foram preparados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. A estrutura do tecido adiposo estava preservada e foi possível visualizar vários vasos sanguíneos com eritrócitos em sua luz (figura15).

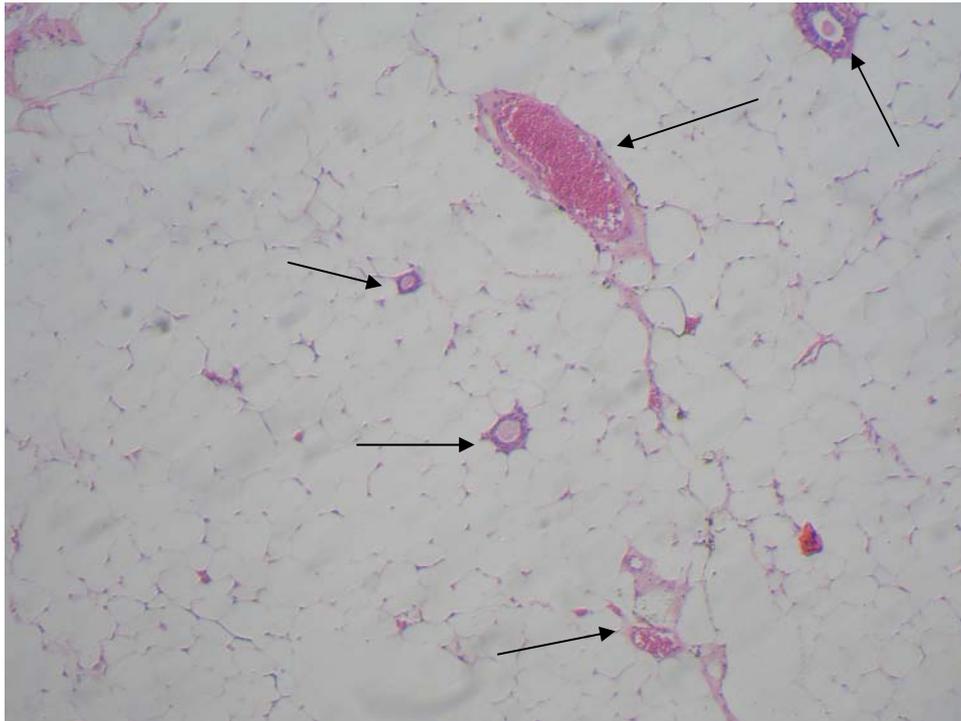


Figura 15: Histologia dos implantes retirados. Após a retirada dos implantes o tecido implantado foi fixado em formol tamponado. O material foi usado para montagem de lâminas histológicas as quais foram coradas com H & E. As setas apontam a vascularização do enxerto mostrando a viabilidade do tecido.

Camundongos deficientes para leptina são importantes como modelo animal para estudos de obesidade, diabetes e outras patologias correlatas. Como estas patologias são determinadas pela interação de numerosos fatores ambientais e genéticos, a geração de animais carregando a mutação no gene *OB* combinado a outras alterações genéticas é essencial para elucidar a importância de genes associados com a obesidade. Entretanto a infertilidade dos camundongos *ob/ob* torna este tipo de cruzamento caro e trabalhoso, tendo de

ser realizado através do cruzamento de animais heterozigotos (*OB/ob*). Com o desenvolvimento da técnica de transplante de TA criou-se a possibilidade de se usar animais homozigotos para os cruzamentos com outros genótipos assim como para a manutenção das maternidades dos animais *ob/ob*. Para este método ser efetivo é necessário que a restauração da fertilidade destes animais através do transplante de TA seja duradoura. Para verificar a eficiência do transplante de tecido adiposo em restabelecer a fertilidade dos animais, 16 camundongos *ob/ob* foram transplantados com 1 g de tecido adiposo e foram colocados com animais férteis para verificar sua atividade reprodutiva durante um ano. Os machos transplantados por esta técnica tiveram sua fertilidade completamente restaurada sendo capazes de fertilizar consecutivamente pelo menos três fêmeas (figura 16) por mais de 10 meses (figura 17). Todas as fêmeas fertilizadas tiveram bom intervalo entre partos os quais resultaram em ninhadas de tamanho normal (figura 18).

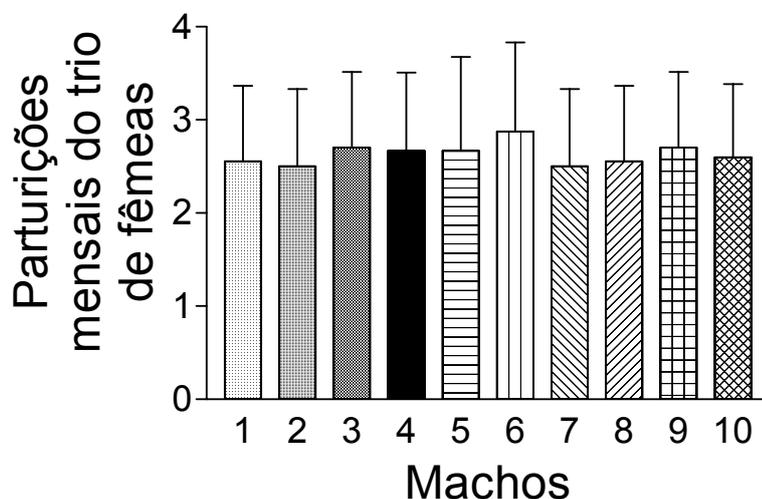


Figura 16: Fêmeas prenhes por macho. Número de gestações ao mês de cada trio de fêmeas colocadas com um macho transplantado. As fêmeas pariam quase todos os meses mostrando boa atividade reprodutiva do macho transplantado.

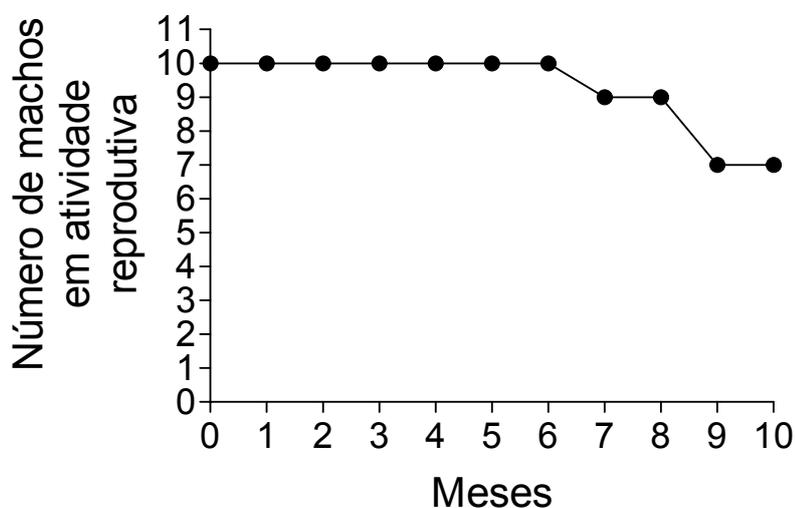


Figura 17: Duração da atividade reprodutiva dos machos transplantados. A maioria dos machos manteve sua atividade reprodutiva efetiva por mais de 10 meses de idade. Alguns deles ainda estavam em atividade após 18 meses do transplante (dados não mostrados).

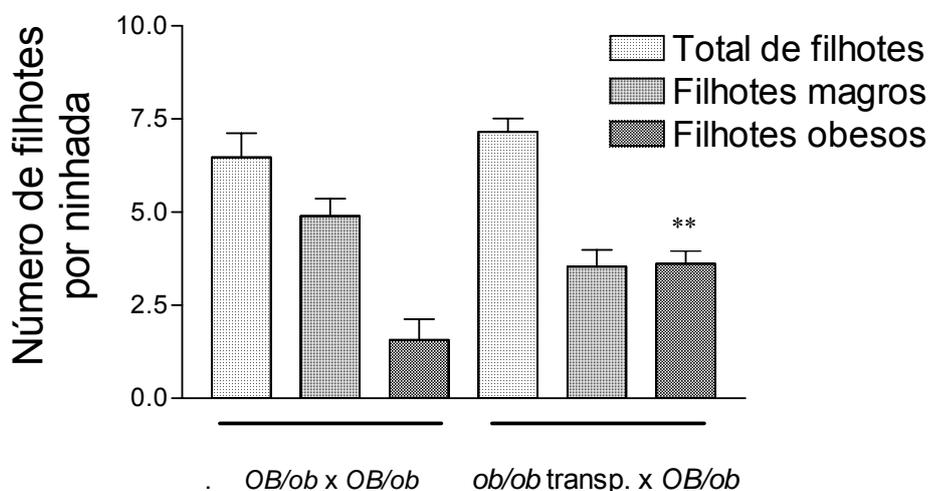


Figura 18: Número de filhotes por ninhada. As fêmeas colocadas com os machos transplantados apresentaram ninhadas de tamanho normal e diferente proporção entre filhotes obesos e magros ($p < 0,01$ comparando filhotes obesos e magros entre os dois diferentes cruzamentos).

Para verificar a restauração da fertilidade em fêmeas foram transplantadas oito fêmeas com 1 g de TA cada. Todas as fêmeas, exceto uma, tiveram sua fertilidade restaurada. A histopatologia do fragmento implantado foi

realizada e sugeriu rejeição tecidual. Uma segunda fêmea mostrou-se fértil, mas desenvolveu canibalismo comendo todas as suas ninhadas. Muitas outras fêmeas mostraram este comportamento após a restauração da fertilidade, mas comiam apenas os filhotes da primeira cria. Uma delas teve quatro ninhadas e parou de se reproduzir. A maioria das fêmeas teve uma vida reprodutiva normal, com partos mensais, comparável a de suas irmãs magras naturalmente férteis. Estas fêmeas transplantadas foram capazes de parir e criar adequadamente em média quase oito filhotes por ninhada (figura 18).

A fertilidade restaurada dos animais *ob/ob* foi usada para acelerar a produção destes animais, assim como a geração dos animais *ob/obB2^{-/-}* e *ob/obB1B2^{-/-}*. A comparação entre este novo método de produção de animais *ob/ob* e o método tradicional foi realizada. O esquema geral destes cruzamentos esta representado nas figuras 19, 20 e 21. No novo método proposto, três semanas após a cirurgia, camundongos machos *ob/obB2^{+/+}* foram colocados para cruzamento com três fêmeas *OB/OBB2^{-/-}*. Para a geração dos animais *ob/obB1B2^{-/-}* foi utilizado o mesmo protocolo. Deste cruzamento resultou em camundongos heterozigotos *OB/obB2^{+/-}* em F1. Como todos os animais desta geração são de mesmo genótipo não houve necessidade de genotipagem para o próximo cruzamento. O cruzamento entre os animais desta ninhada gerou 74 camundongos com diversos genótipos em F2. Todas as 36 fêmeas foram genotipadas para gene do receptor B2 de cininas, revelando duas duplo-mutantes (*ob/obB2^{-/-}*), identificadas pelo fenótipo obeso, e seis fêmeas *B2^{-/-}* magras as quais foram genotipadas também para a mutação no gene da leptina, resultando em quatro fêmeas *OB/obB2^{-/-}*. Nove machos obesos foram genotipados para o gene do receptor B2, mostrando dois animais *ob/obB2^{-/-}* duplo-mutantes.

Tanto os machos quanto as fêmeas duplo mutantes foram transplantados com 1 g de TA proveniente de irmãos magros de mesma ninhada. Uma estratégia combinada de cruzamentos foi usada para maximizar o número de animais obesos em F3. Cada macho transplantado foi colocado com uma fêmea transplantada duplo homozigota e duas fêmeas *OB/obB2^{-/-}*. Em F3, obtivemos 14

machos e 13 fêmeas duplo-mutantes. Também foram obtidos 5 machos e 6 fêmeas com genótipo *OB/obB2*^{-/-} nesta geração.

Neste experimento, um total de 136 animais foram usados para se obter 27 *ob/obB2*^{-/-}. Apenas 48 reações de genotipagem para o gene do receptor B2 de cininas e 6 para o gene *OB* foram necessárias (tabela 4). Este método reduz em quatro vezes o número de animais utilizados para gerar animais duplo-mutantes obesos (de 19,7 a 5,0 animais usados, por animal duplo-mutante produzido em F3) e minimiza o número de etapas com genotipagens (de 3 para uma etapa de genotipagem e 66 para 6 ensaios para a genotipagem do gene *OB*).

A aplicação da técnica de transplante de tecido adiposo melhorou drasticamente tanto a geração de camundongos derivados dos animais *ob/ob* como a produção destes e manutenção das maternidades, reduzindo o número de animais utilizados nestes processos produtivos (tabelas 3 e 4). A partir desses dados, um artigo submetido a uma revista internacional foi confeccionado (anexo 4)

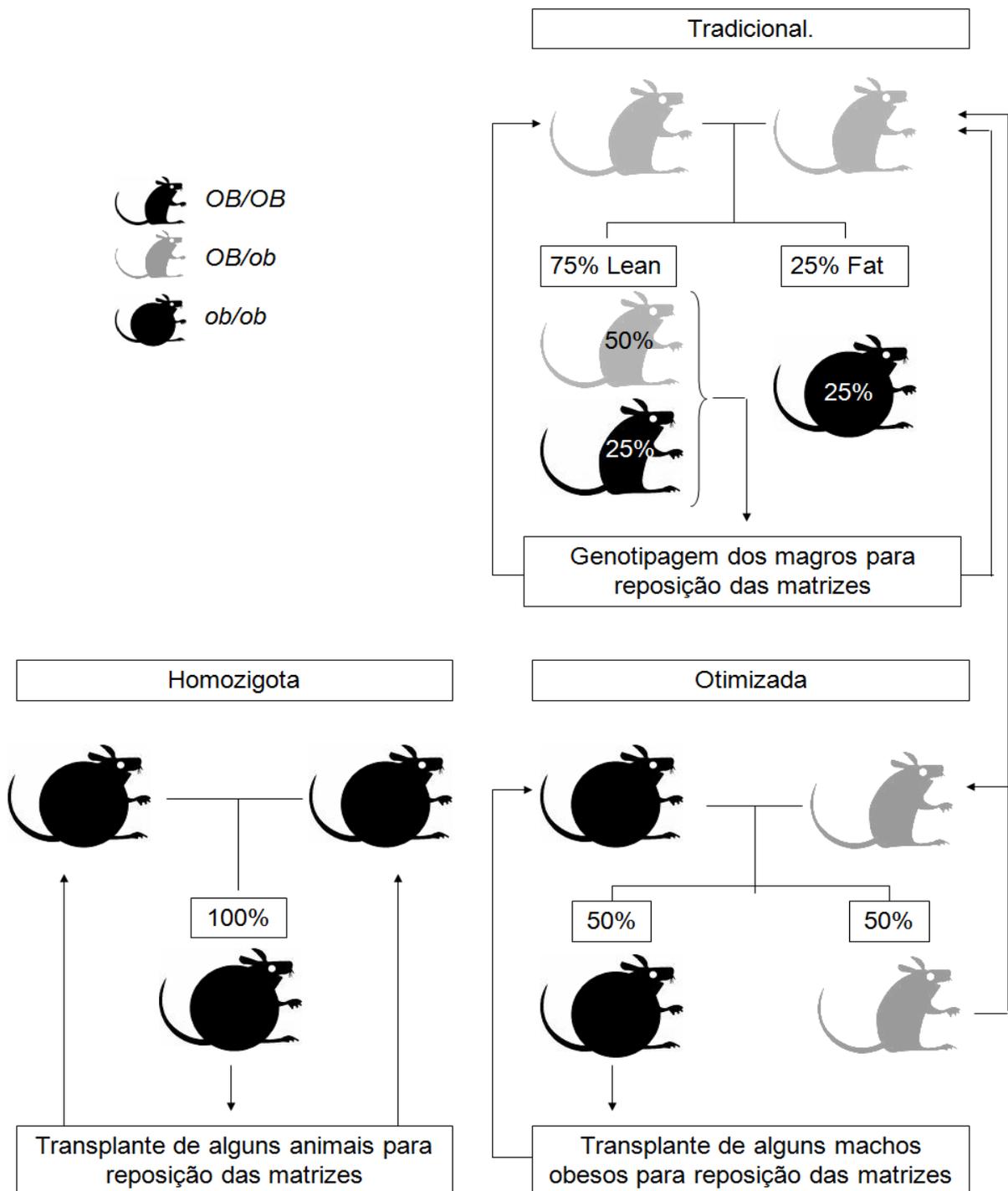


Figura 19: Diagrama representando os três possíveis cruzamentos para criação de camundongos *ob/ob*. As maternidades chamados aqui de homozigota e otimizada dependem do transplante de tecido adiposo, mas dispensam totalmente a genotipagem dos animais devido ao fato que seus produtos poderem ser diferenciados fenotipicamente.

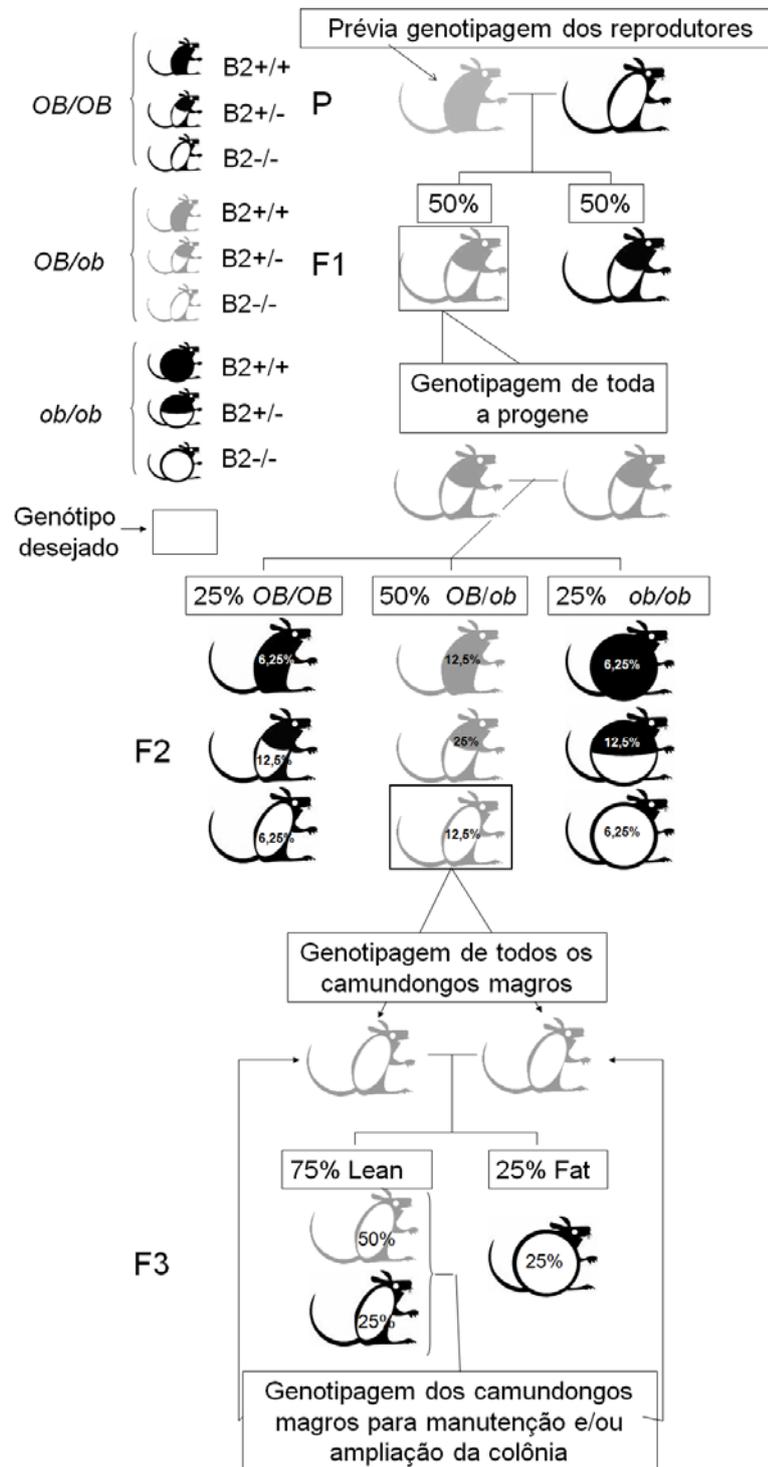


Figura 20: Esquema de cruzamentos tradicional para produção de animais transgênicos e deficientes em leptina.

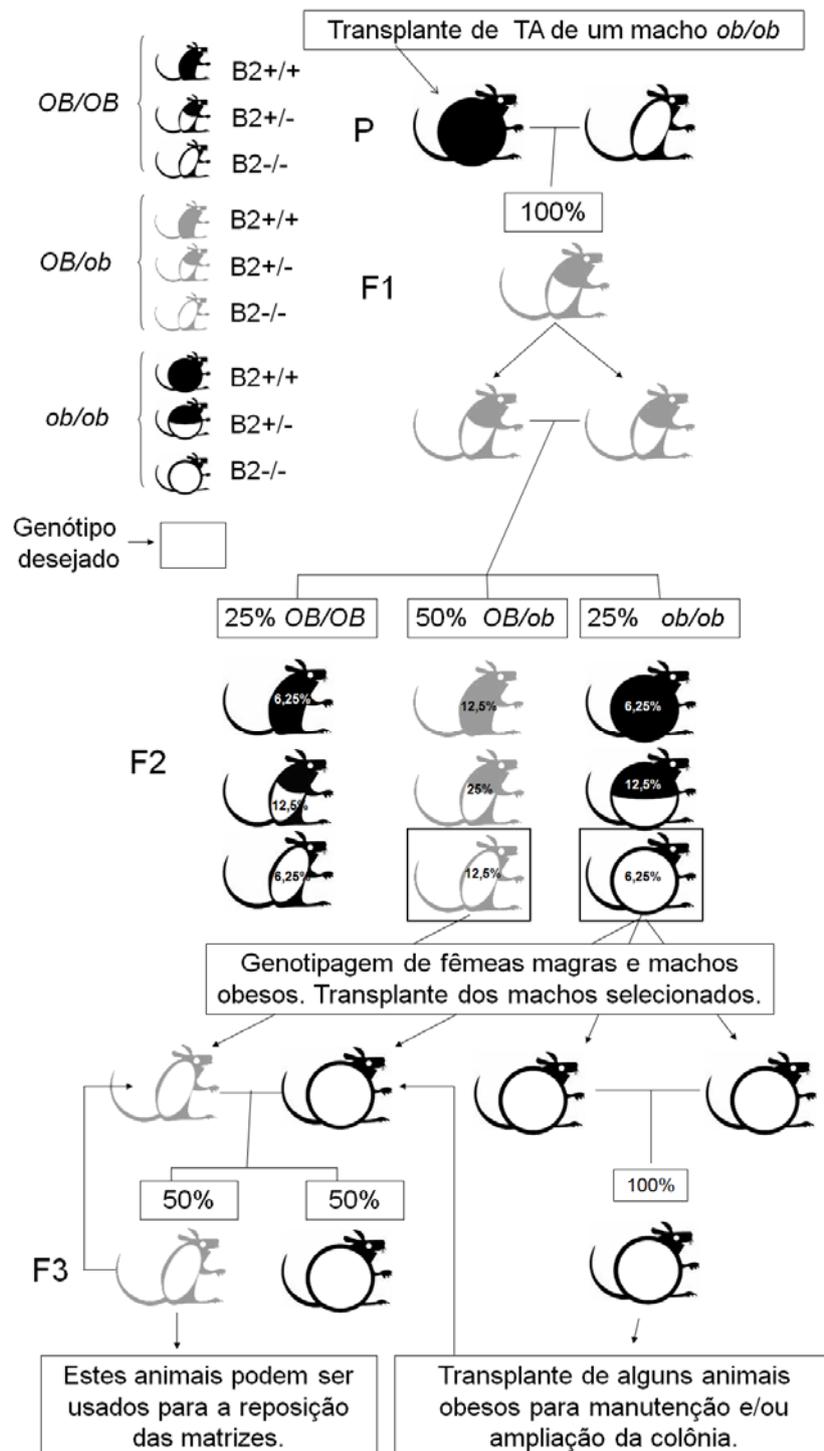


Figura 21: Esquema de cruzamentos alternativo para produção de animais transgênicos e deficientes em leptina. O menor número de genotipagens, o menor número de animais utilizados e maior proporção de animais obesos produzidos podem ser observados neste diagrama.

Tabela 3: Resultado do esquema tradicional de cruzamento para obtenção de *ob/obB2-/-* (sem transplante de tecido adiposo).

	P	F1	F2	F3	Total
Total de animais	6♂ 9♀	28♂(32) 31♀(32)	44♂(50) 51♀(50)	25♂(25) 23♀(25)	217 animais
Nº de selecionados	3♂(<i>OB/obB2+/+</i>) 9♀(<i>OB/OBB2-/-</i>)	7♂(<i>OB/obB2+/-</i>) 14♀(<i>OB/obB2+/-</i>)	4♂(<i>OB/obB2-/-</i>) 7♀(<i>OB/obB2-/-</i>)	5♂(<i>ob/obB2-/-</i>) 6♀(<i>ob/obB2-/-</i>) 4♂(<i>OB/obB2-/-</i>) 10♀(<i>OB/obB2-/-</i>)	11 obesos (5♂ + 6♀)
Nº de genotipados	6♂(<i>ob gene</i>)	12♂(<i>ob gene</i>) 31♀(<i>ob gene</i>)	7♂(<i>ob gene</i>) 10♀(<i>ob gene</i>) 24♂(B2R gene) 37♀(B2R gene)	10♂(<i>ob gene</i>)* 17♀(<i>ob gene</i>)*	93 (<i>ob gene</i>) 61 (B2R gene)

*necessário somente para a manutenção e/ou ampliação da colônia.

Tabela 4: Resultados do esquema alternativo para produção de *ob/obB2-/-* usando o transplante de tecido adiposo.

	P	F1	F2	F3	Total
Total de animais	1♂ 3♀	9♂(10) 11♀(10)	38♂(39) 36♀(39)	19♂(21) 19♀(21)	136 animais
Nº de selecionados	1♂(<i>ob/obB2+/+</i>) 3♀(<i>OB/OBB2-/-</i>)	9♂(<i>OB/obB2+/-</i>) 11♀(<i>OB/obB2+/-</i>)	2♂(<i>ob/obB2-/-</i>) 2♀(<i>ob/obB2-/-</i>) 4♀(<i>OB/obB2-/-</i>)	14♂(<i>ob/obB2-/-</i>) 13♀(<i>ob/obB2-/-</i>) 5♂(<i>OB/obB2-/-</i>) 6♀(<i>OB/obB2-/-</i>)	27 obesos (14♂ + 13♀)
Nº de genotipados	0	0	9♂(B2R gene) 36♀(B2R gene) 6♀(<i>ob gene</i>)	0	6 (<i>ob gene</i>) 45 (B2R gene)
Nº de transplantados	1♂(<i>ob-/-B2+/+</i>)	0	2♂ 2♀	7♂* 6♀*	10♂ 8♀

* necessário somente para a manutenção e/ou ampliação da colônia.

4.3 Análise da contração do músculo liso de estômago (Análise fenotípica molecular)

Para verificar a ausência dos receptores de cininas nos tecidos dos animais gerados, fatias de músculo liso foram retiradas do *fundus* do estômago dos animais *ob/obB1B2^{-/-}* (linha superior) e *ob/obB2^{-/-}* (linha inferior da figura 22), montadas em banhos individuais, acopladas a um transdutor de força. Os tecidos foram estimulados com Cloreto de Potássio (KCl) e Carbacol (Cch) para verificar a viabilidade da montagem e da reatividade dos tecidos à despolarização das membranas e à ativação dos receptores muscarínicos do sistema parassimpático, respectivamente. Os tecidos contraíram adequadamente a estes estímulos, e foram submetidos aos agonistas dos receptores B1 e B2 de cininas (Des-Arg⁹-Bradicinina e Bradicinina, respectivamente). Como esperado o tecido do animal nocaute para ambos receptores não respondeu a nenhum dos agonistas, já o tecido do animal deficiente apenas ao receptor B2 de bradicinina, respondeu adequadamente ao agonista do receptor B1 (50% da contração observada sob exposição ao Carbacol) sem mostrar qualquer reação à bradicinina (figura 22 B). Em seguida os tecidos foram submetidos novamente ao Carbacol para verificar se as montagens continuavam estáveis e biologicamente ativas (figura 22 A, último fragmento).

4.4 Desenvolvimento corporal dos animais gerados

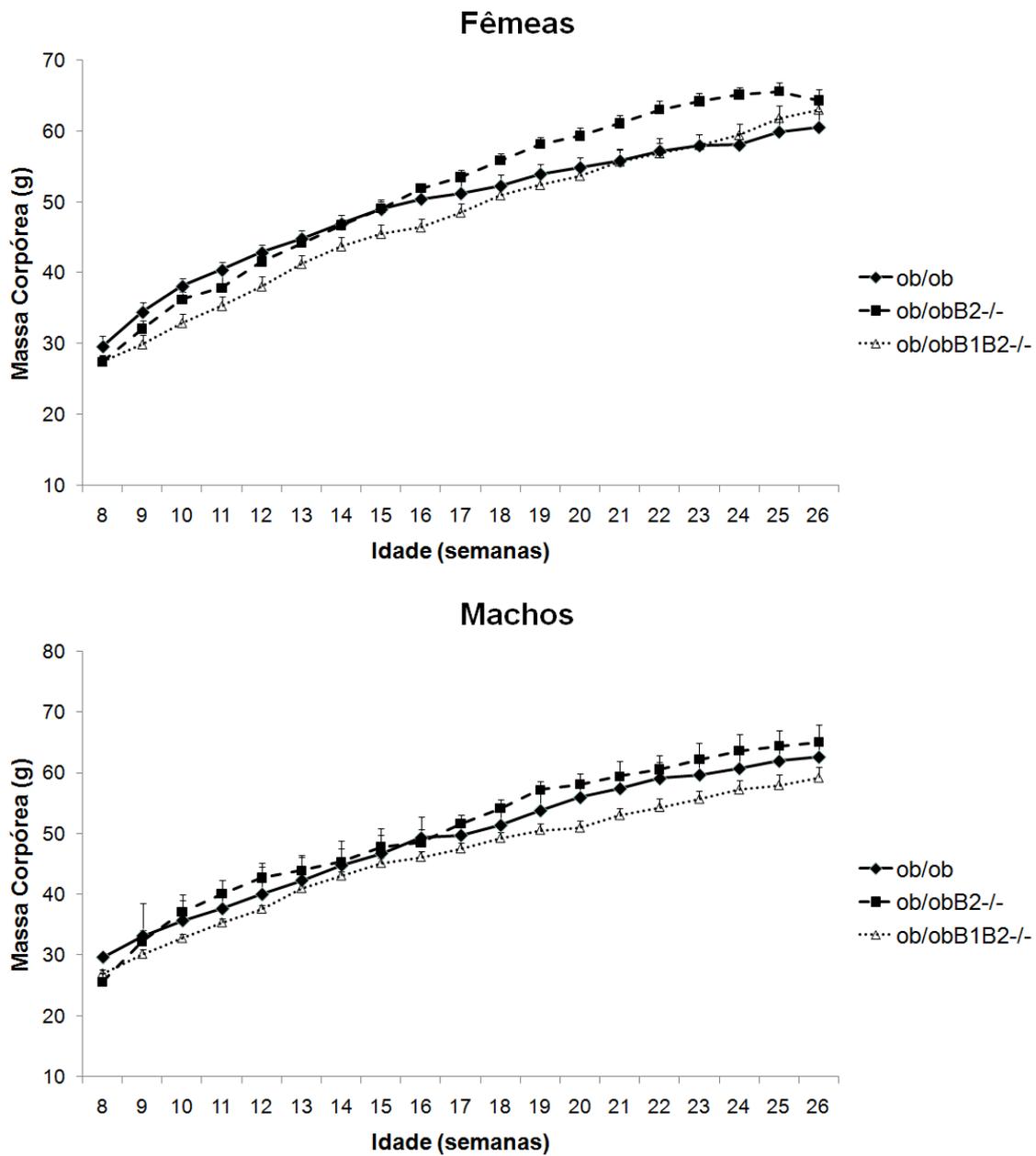


Figura 23: Curvas de crescimento. Massa dos camundongos aferida semanalmente.

Os animais deficientes para leptina e nocautes para os receptores de cininas gerados (*ob/obB2*^{-/-} e *ob/obB1B2*^{-/-}) assim como seus controles (*ob/obB1B2*^{+/+}) tiveram suas massas aferidas durante 26 semanas e apresentaram desenvolvimento corpóreo semelhante (figura 23). Uma tendência de maior ganho de peso foi observada nos animais *ob/obB2*^{-/-}, o que não ocorreu com os animais *ob/obB1B2*^{-/-}. Comparando-se as massas de um número maior de animais na 30^a semana de idade estas diferenças foram confirmadas nas fêmeas (figura 24).

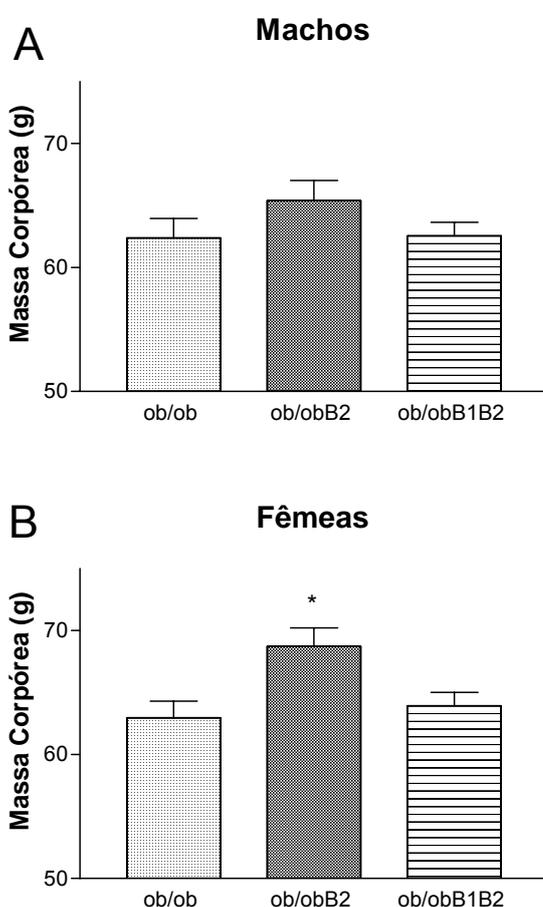


Figura 24: Massa corpórea com 30 semanas. Os animais *ob/obB2*^{-/-} tendem a ser maior. P < 0,05 quando as fêmeas deste genótipo são comparadas com os outros dois genótipos.

4.5 Massa dos órgãos

Após os testes glicêmicos, os animais foram eutanasiados, tiveram os seguintes órgãos coletados: fígado, baço, pâncreas, rins, e músculo esquelético (tríceps sural). A massa dos órgãos foram aferidas e comparadas. Nas fêmeas foi observado um aumento no tamanho do fígado dos animais *ob/obB1B2-/-* (figura 25). A massa do fígado nestas fêmeas é semelhante a do fígado dos machos, os quais não apresentaram diferenças entre as massas deste órgão, mas todas acima de 50 mg/kg de peso vivo (figura 26). Uma diminuição no tamanho do pâncreas foi observada também nestas fêmeas, e novamente esta alteração não aparece nos machos.

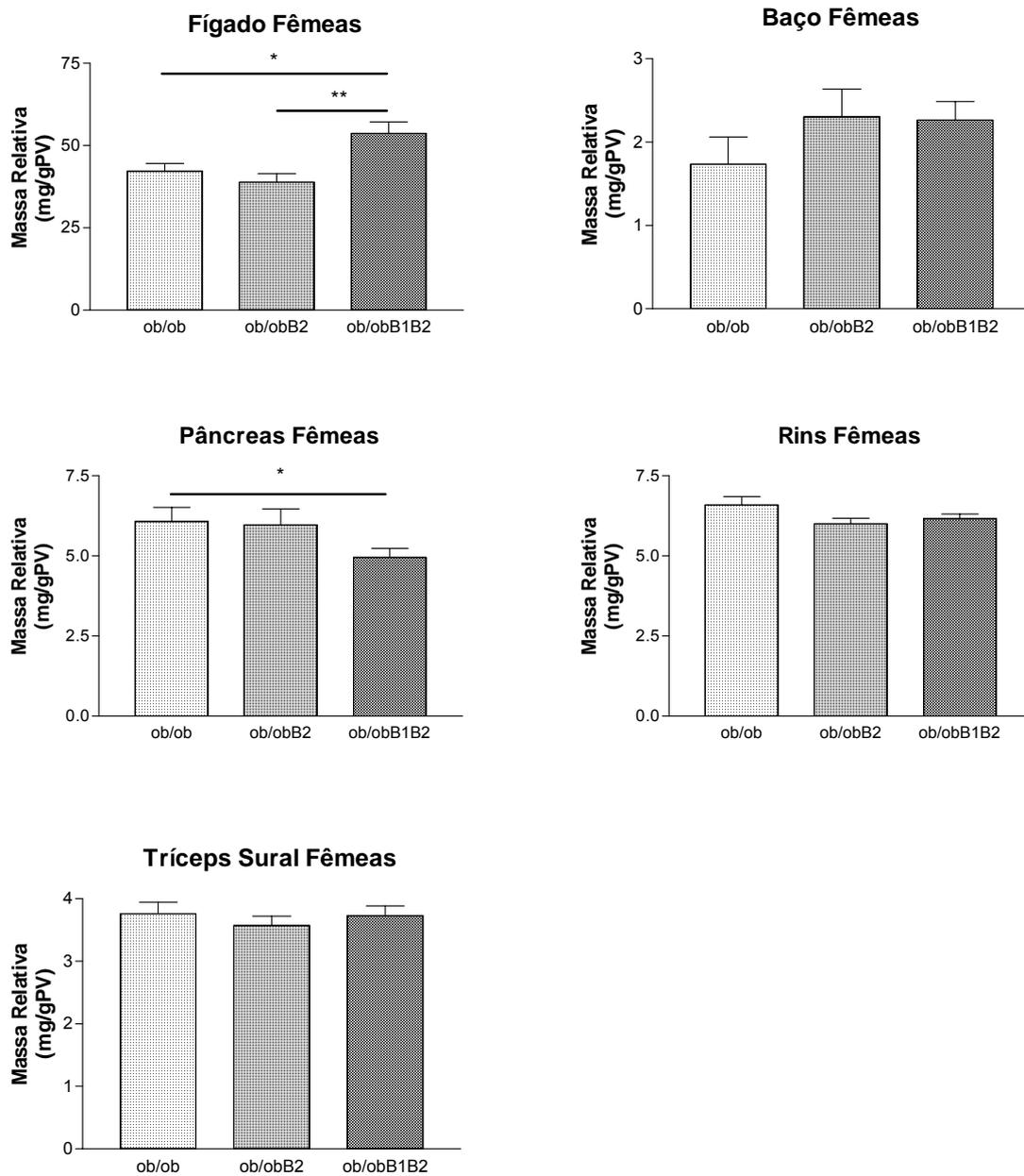


Figura 25: Massa relativa dos órgãos das fêmeas aos 6 meses de idade. A massa dos órgãos foi dividida pela massa corpórea total, $n = 7$ a 10 ; * = $P < 0,05$ e ** = $P < 0.001$.

O baço nos machos deficientes para ambos receptores de cininas apresentou-se aumentado com relação ao grupo controle (figura 26). Nota-se também uma tendência dos rins em serem menores nos modelos biológicos gerados.

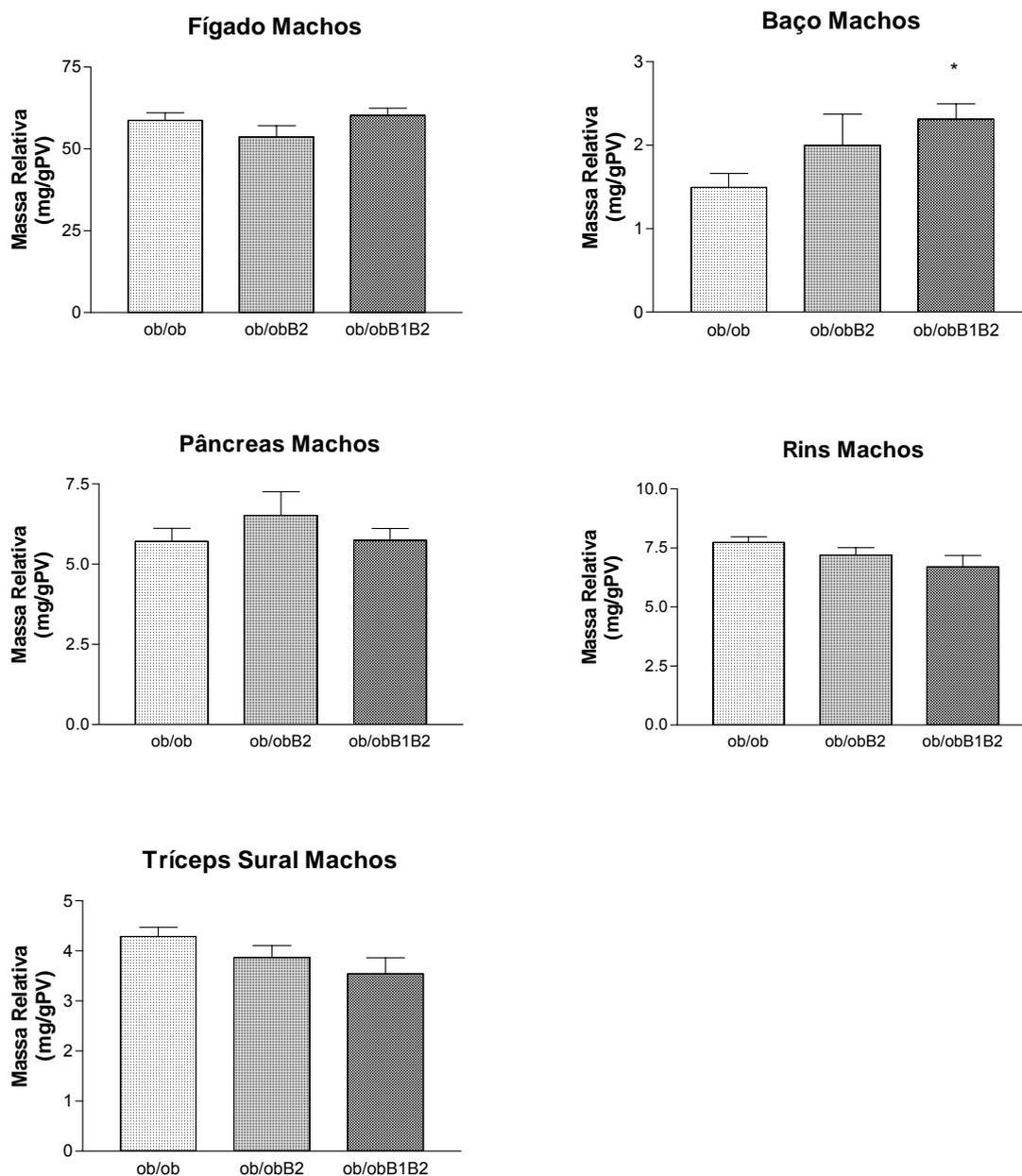


Figura 26: Massa relativa dos órgãos dos machos aos 6 meses de idade. A massa dos órgãos foi dividida pela massa corpórea total, n = 7 a 10; * = P < 0,05 e ** = P < 0.001.

4.5.1 Coração e câmaras cardíacas

Um dos órgãos analisados foi o coração. Este foi retirado e lavado em salina. Depois de ter sua massa aferida foram separadas as câmaras cardíacas. Comparando as massas relativas verificou se uma diferença entre os ventrículos esquerdos das fêmeas deficientes para ambos receptores de cininas (figura 27).

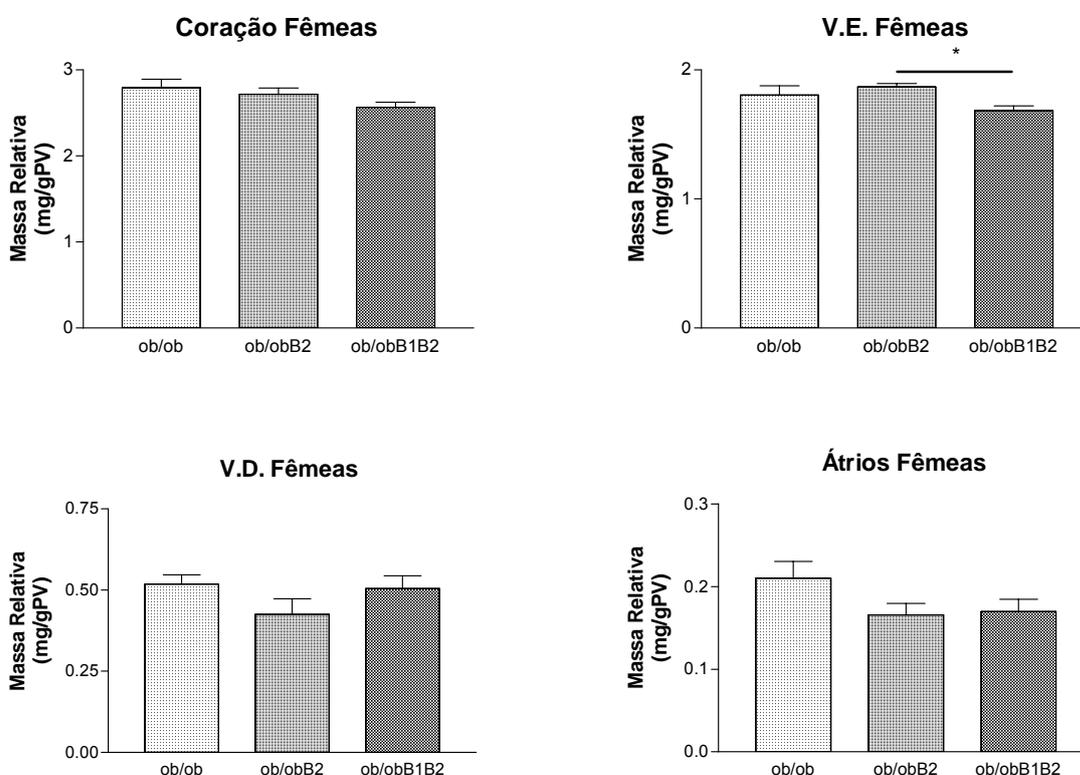


Figura 27: Massas relativas do coração e de suas câmaras em fêmeas. V.E. = ventrículo esquerdo; V.D. = ventrículo direito; * = $P < 0,05$.

A diferença entre os ventrículos esquerdos não se confirma nos machos (figura 28), os quais possuem uma massa relativa do coração maior ao das fêmeas quando somamos os dados de todos os grupos juntos (figura 29). Tanto o

coração como o ventrículo esquerdo dos machos deste genótipo eram maiores em valores absolutos como mostrado no anexo 1.

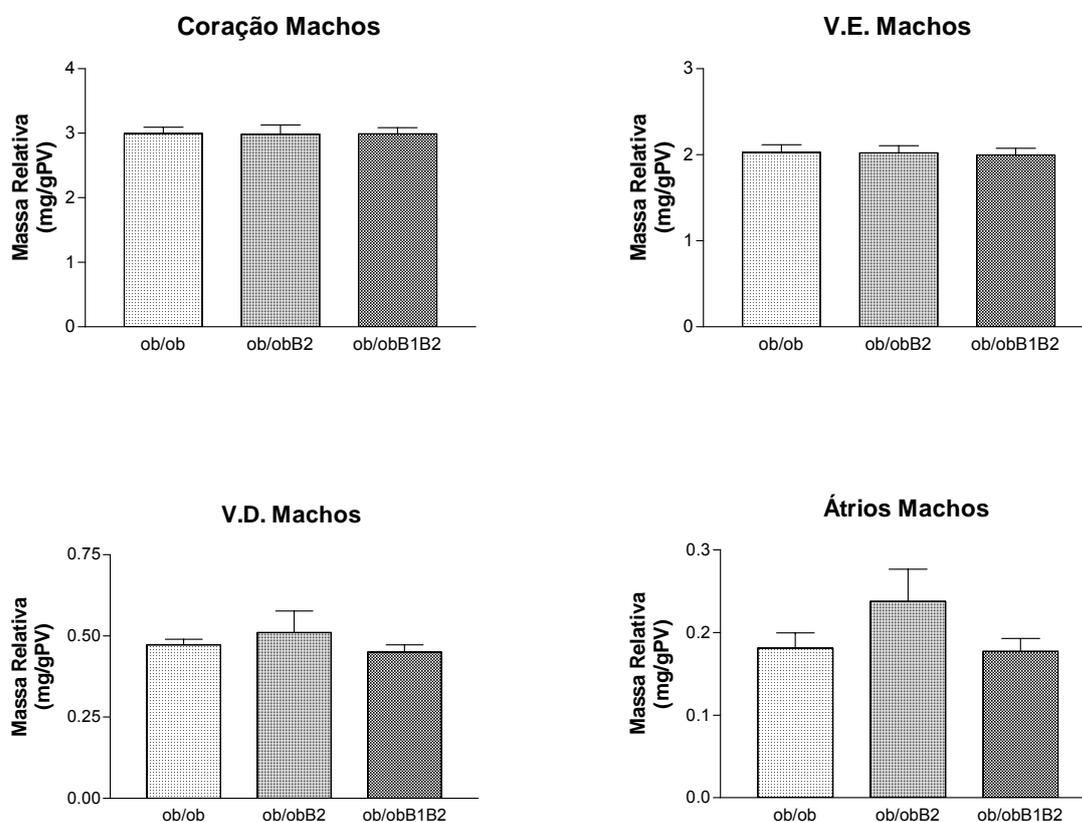


Figura 28: Massas relativas do coração e de suas câmaras em machos. V.E. = ventrículo esquerdo; V.D. = ventrículo direito.

Coração

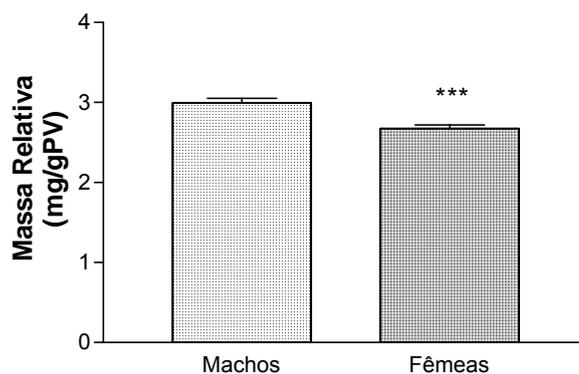


Figura 29: Comparação entre as massas relativas do coração de machos e fêmeas. $P < 0,001$.

4.6 Massa do Tecido adiposo

O conhecimento de que o tecido adiposo é importante na regulação da massa corpórea e do metabolismo, assim como de que o tecido adiposo de diferentes posições anatômicas tem características metabólicas diferentes nos levou a aferir a massa de diferentes partes anatômicas e relacioná-las.

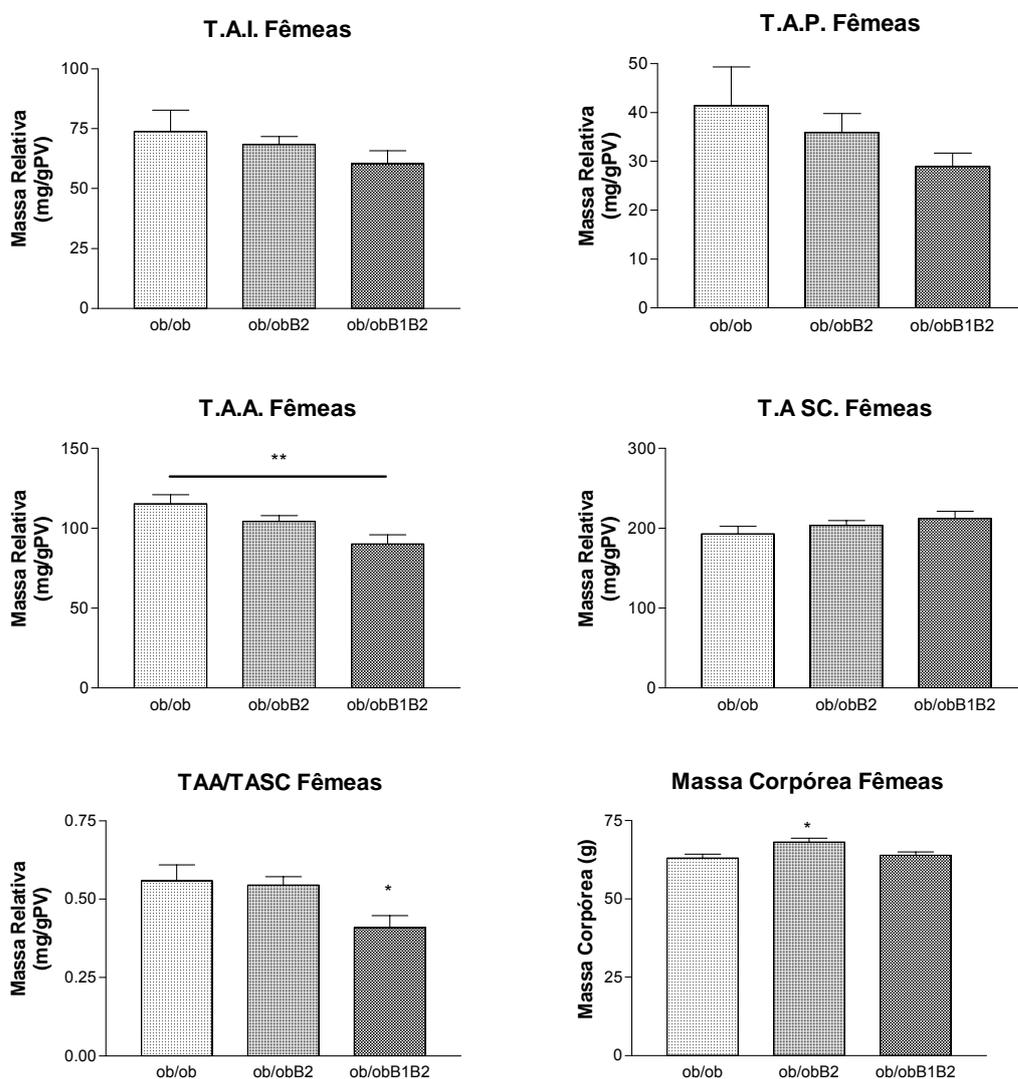


Figura 30: Massa do tecido adiposo de fêmeas. TAI = tecido adiposo inguinal; TAP = tecido adiposo peri-renal; TAA = soma de TAI e TAP; TASC = tecido adiposo subcutâneo; * = $P < 0,05$ e ** = $P < 0,01$.

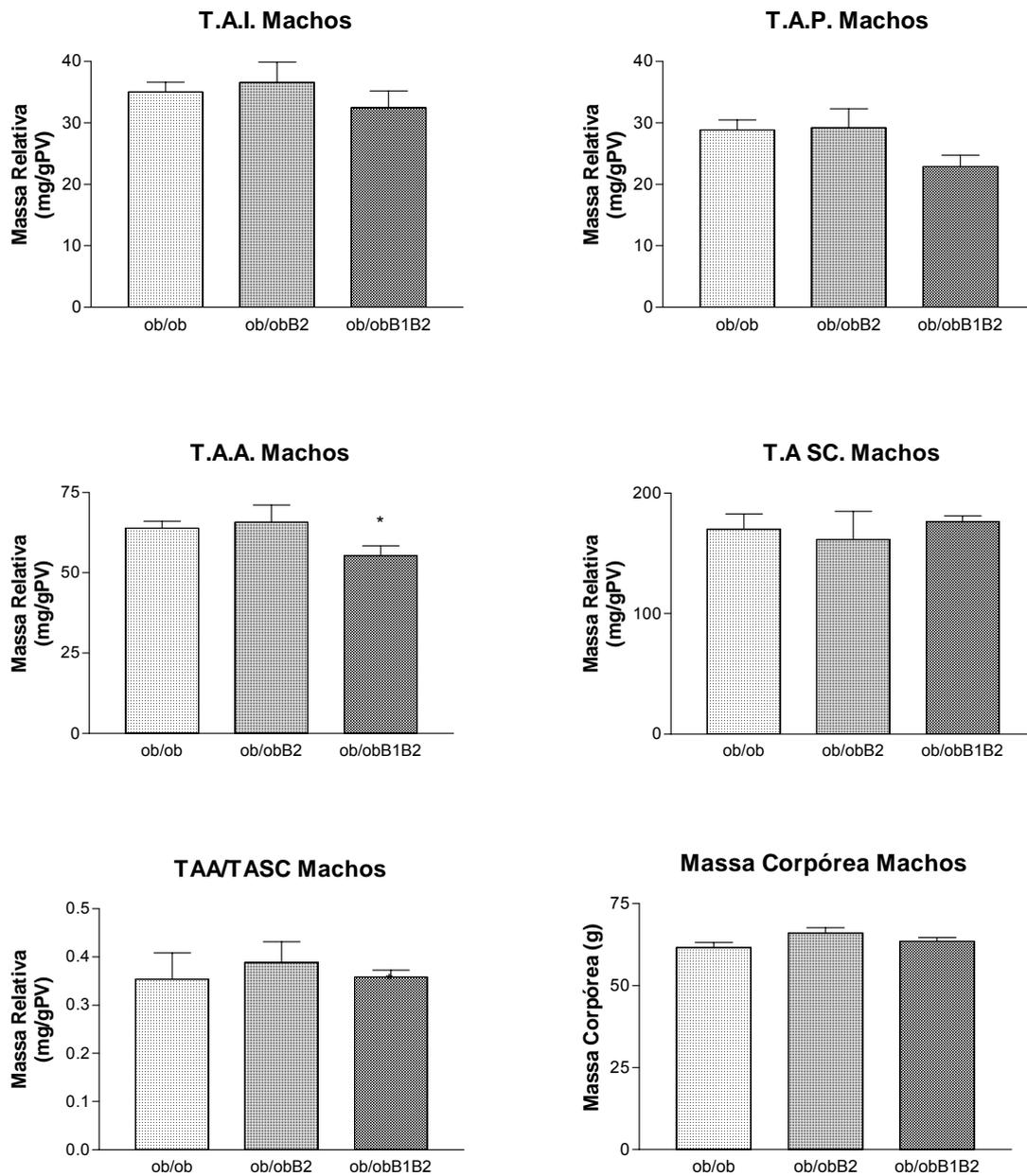


Figura 31: Massa do tecido adiposo de machos. TAI = tecido adiposo inguinal; TAP = tecido adiposo peri-renal; TAA = soma de TAI e TAP; TASC = tecido adiposo subcutâneo; * = $P < 0,05$ e ** = $P < 0,01$.

Tantos as fêmeas quanto os machos *ob/obB1B2*^{-/-} apresentaram menor massa relativa do tecido adiposo abdominal aferido (figuras 30 e 31). Isso refletiu

em uma menor porcentagem do tecido abdominal nas fêmeas deste genótipo em comparação com o grupo controle. As fêmeas de todos os grupos apresentaram quase o dobro de TAI do que os machos (anexo 1). Elas também possuem mais tecido adiposo total.

4.7 Glicemia e Insulinemia

Para avaliar a glicemia dos animais foram realizados os testes de tolerância à glicose (TTG) e de resistência à insulina (TRI). Os testes foram realizados em dois momentos: aos 90 dias de idade e aos 180 dias de idade. Houve uma semana de intervalo entre os diferentes testes para a recuperação adequada dos animais. Os resultados mostram que os animais deficientes em receptores de cininas respondem diferentemente ao metabolismo de glicose e que estas diferenças alteram à medida que os animais vão ficando mais velhos (figuras 32 e 33). Os resultados mostram que os animais *ob/ob*, como descrito na literatura (LINDSTROM, 2007), apresentam hiperglicemia acentuada aos 90 dias, aumentando sua capacidade de captação de glicose após 26 semanas de idade, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Já os modelos gerados, que são deficientes nos receptores de cininas, mostraram uma tendência inversa. Os animais do genótipo *ob/obB1B2^{-/-}*, de modo geral, foram os que apresentaram uma menor captação de glicose com o avançar da idade, em especial nas fêmeas, sendo essas alterações muito maiores que as observadas nos machos de mesmo genótipo.

Na figura 34 podemos ver a comparação entre as curvas glicêmicas dos modelos deficientes para a leptina e seus controles magros. Os dados dos animais *B2^{-/-}* foram cedidos gentilmente por Felipe Reis sendo parte de sua dissertação de mestrado. Há diferença entre os protocolos de jejum usados neste trabalho e por Felipe Reis. A retirada da maravalha das caixas para o jejum dos animais altera em aproximadamente 20% a glicemia basal dos animais (figura 35).

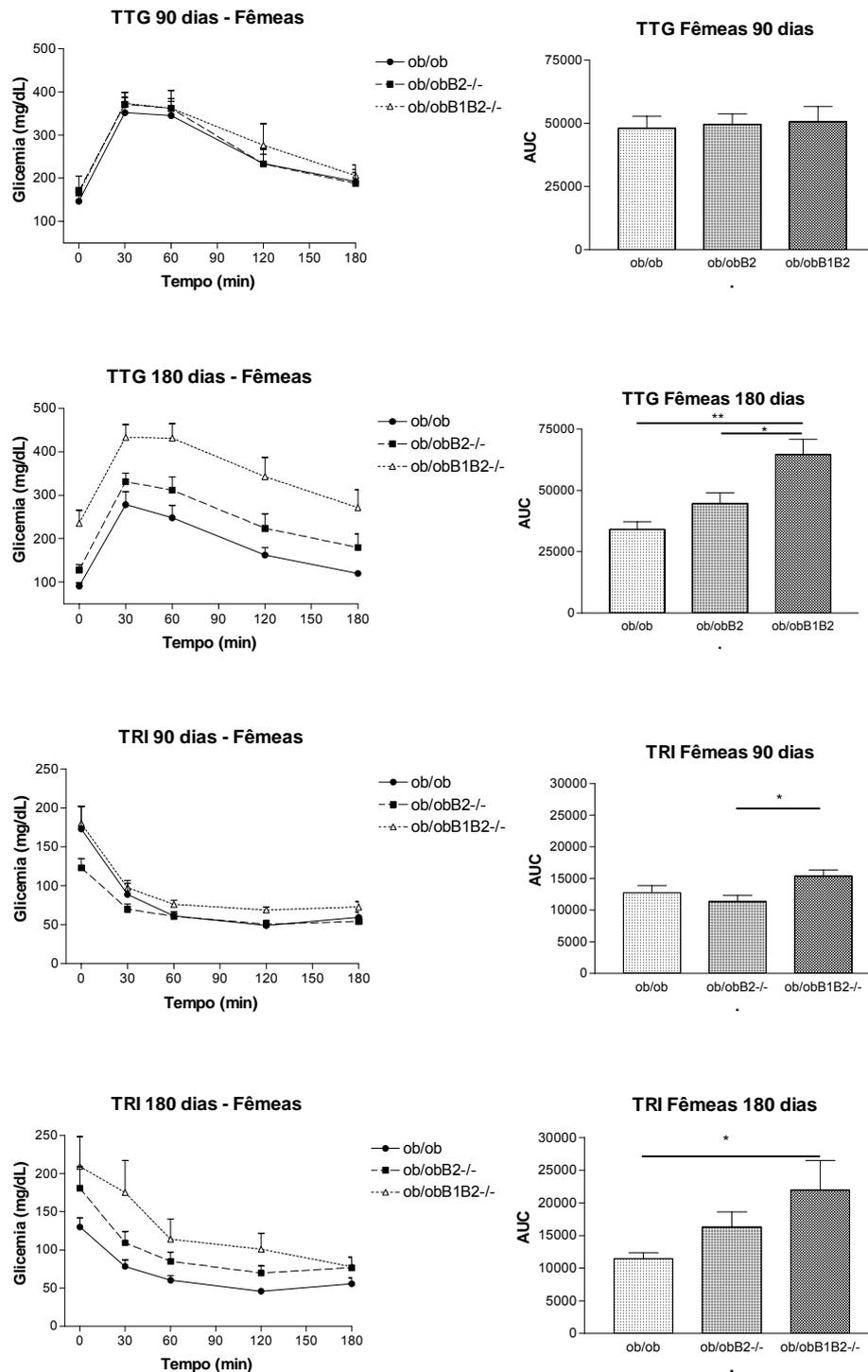


Figura 32: Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de resistência à insulina (TRI) das fêmeas. Os testes foram realizados em duas idades diferentes (3 e 6 meses de idade). Os gráficos em barras representam a área sob a curva (AUC). * = $P < 0,05$ e ** = $P < 0,01$; n entre 7 e 10 para cada grupo.

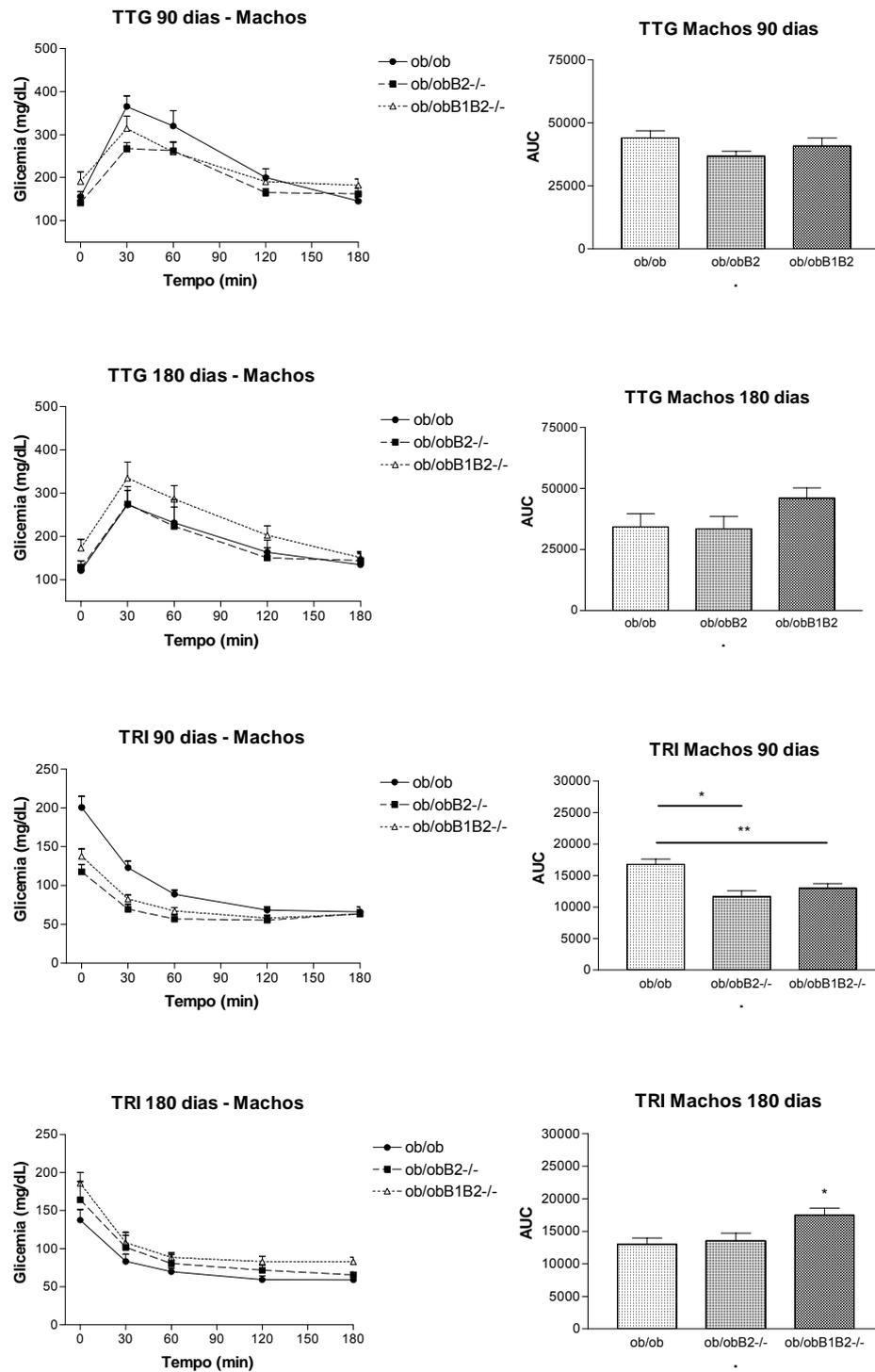


Figura 33: Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de resistência à insulina (TRI) dos machos. Os testes foram realizados em duas idades diferentes (3 e 6 meses de idade). Os gráficos em barras representam a área sob a curva (AUC). * = $P < 0,05$ e ** = $P < 0,01$; n entre 7 e 10 para cada grupo.

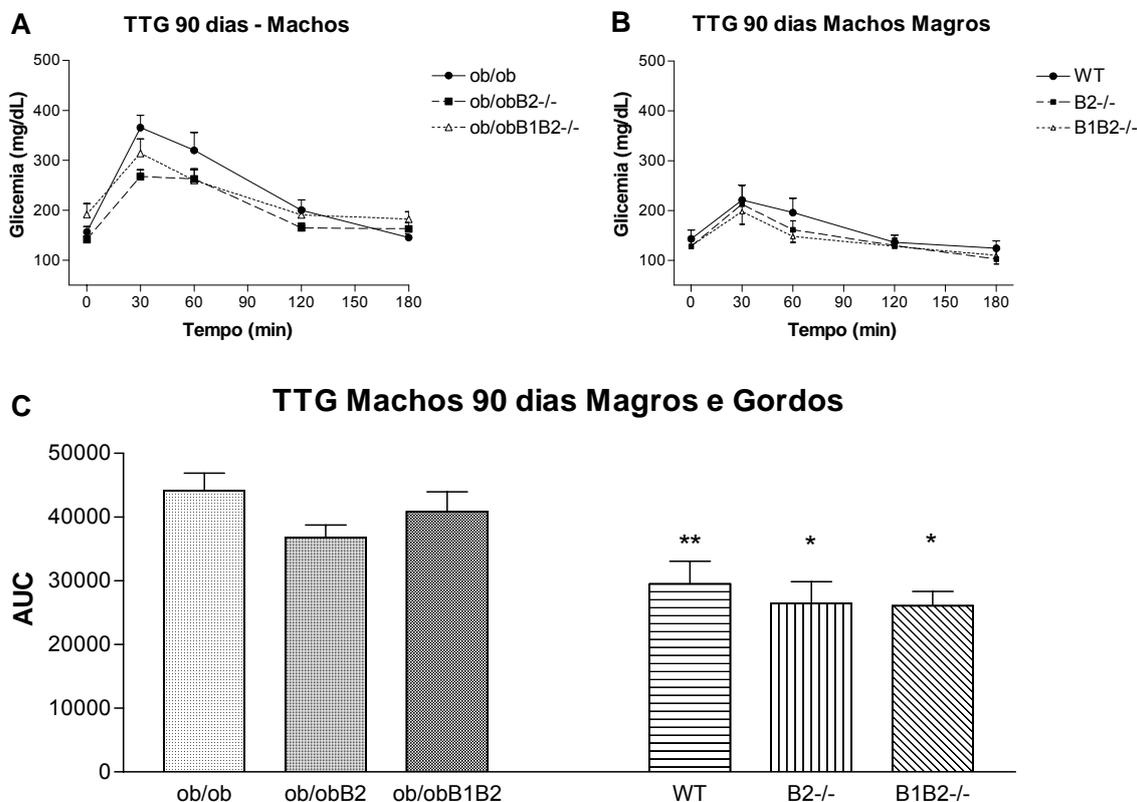


Figura 34: Comparação das curvas glicêmicas entre os animais *ob/ob* e seus controles magros. A) TTG dos camundongos deficientes para a leptina aos 3 meses de idade. B) TTG dos controles magros. Os dados dos animais B2^{-/-} foram cedidos por Felipe Reis e estão publicados em sua dissertação de mestrado. C) Área sob as curvas (* = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$ em comparação com o animal deficiente para a leptina de mesmo genótipo para os receptores de cinina; $n \geq 5$) A elevada glicemia basal dos animais magros é devida a diferença no protocolo de jejum. Todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas sendo que os animais *ob/ob* tiveram suas camas retiradas.

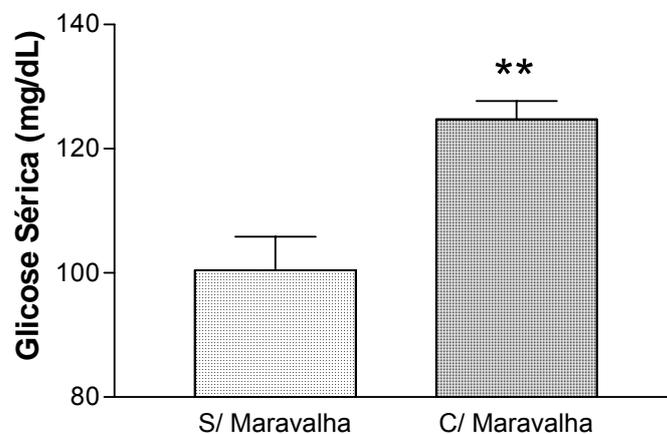


Figura 35: Comparação dos protocolos de jejum. Dois grupos de camundongos WT foram submetidos ao jejum de 12 horas com e sem maravalha (** $p < 0,01$, $n = 7$).

Ao observarmos a insulina sérica dos animais, a qual foi aferida após 6 meses de idade, nota-se que os as fêmeas deficientes para ambos os receptores, apesar de terem maior resistência à insulina (figura 32; $P < 0,05$) quando comparadas aos animais controle, não conseguem liberar uma maior quantidade de insulina. Já os machos do mesmo genótipo, que também apresentam maior resistência à insulina nesta idade e uma captação de glicose semelhante a dos outros grupos (figura 33, $P < 0,05$), apresentam uma maior liberação de insulina (figura 36, $P < 0,01$).

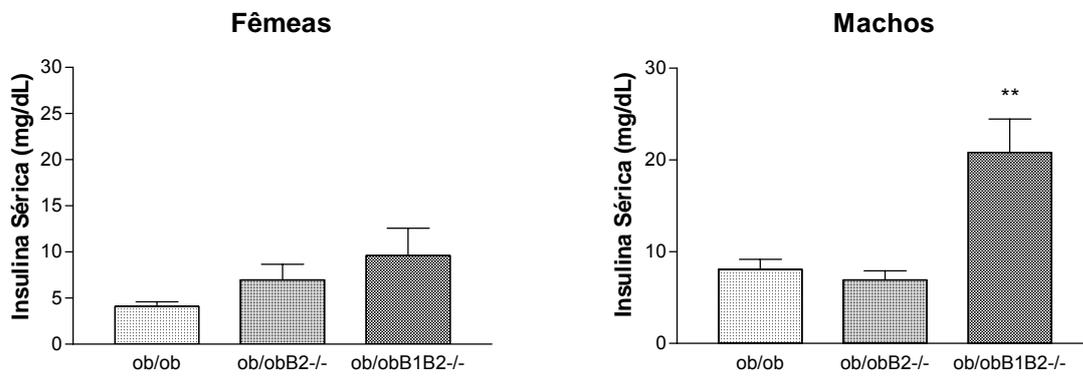


Figura 36: Insulina sérica aos 6 meses de idade. Amostras de sangue obtidas por punção retro-orbital após jejum de 12 horas. ** = $P < 0,01$ quando comparada aos outros dois grupos.

5 Discussão

Animais transgênicos têm sido amplamente utilizados para estudos fisiopatológicos. Estes modelos ajudam a elucidar mecanismos bioquímicos e suas interferências no organismo como um todo, sendo uma importante ferramenta para o estudo das reações fisiológicas relativa às alterações moleculares inseridas nos genomas destes animais (RYFFEL, 1996). Os camundongos, como modelos biológicos, oferecem a oportunidade de manipulação de seu genoma numa técnica específica: a deleção genética. Nesta espécie é possível “desligar” um gene através de técnicas de biologia molecular, de maneira direcionada, criando-se assim os modelos chamados nocaute (KO), onde parte do gene alvo específico pode ser retirada do genoma destes animais e substituída por outra seqüência de DNA que algumas vezes são os cassetes de neomicina. Quando temos modelos com alterações gênicas localizadas em diferentes cromossomos é possível a combinação destas alterações através de cruzamentos e seleção por genotipagem ou por características fenotípicas conhecidas.

A obesidade ocorre pelo desequilíbrio energético no organismo (HOFBAUER, 2002). A massa corpórea é finamente regulada por diversos sistemas incluindo o sistema nervoso central e autônomo, e o sistema endócrino (CLEMENT e FERRE, 2003). Estes sistemas recebem informações dos tecidos periféricos e regulam o metabolismo, a ingestão alimentar, a atividade física espontânea e a reprodução nos indivíduos. Diversos fatores genéticos já foram reconhecidos como determinantes de obesidade ou da predisposição a esta condição (DAHLMAN e ARNER, 2007). Na compreensão destes fatores e suas correlações, os modelos animais são ferramentas fundamentais (BROCKMANN e BEVOVA, 2002). Um dos mais usados entre estes modelos é o camundongo deficiente para a leptin (*ob/ob*).

O sistema caliceína-cininas (SCC) está envolvido no controle da pressão arterial, vasodilatação, inflamação e atividade do músculo liso (BHOOLA *et al.*,

1992; DRAY e PERKINS, 1993; SCHOLKENS, 1996; NSA ALLOGHO *et al.*, 1998). No SCC existem dois receptores efetores conhecidos como receptores B1 e B2 os quais são responsáveis pelos efeitos intracelulares de seus agonistas. Outros estudos mostraram que estes receptores também estão envolvidos em outras vias metabólicas inclusive com a translocação do transportador de glicose GLUT4 no tecido adiposo e muscular por uma via independente da insulina *in vitro* (KISHI *et al.*, 1998). Os modelos biológicos fornecem a oportunidade de verificação *in vivo* destas constatações feitas anteriormente *in vitro*. Nosso grupo, através do uso de animais transgênicos, mostrou que estes receptores também podem estar envolvidos nos processos de resistência à insulina e à leptina, pois os animais nocaute para o receptor B1 de cininas se mostraram mais sensíveis à ação destes hormônios, o que foi também confirmado com o uso do animal *ob/obB1-/-* e pela administração de antagonista do receptor B1, SSR240612, a animais normais. Também foi mostrado que o animal nocaute B1 tem resistência à obesidade quando exposto à dieta hiperlipídica. Usando-se o animal híbrido *ob/obB1-/-*, notou-se que este não apresentava a mesma característica, mas que era mais sensível à administração de leptina exógena que o *ob/ob* controle. Desta forma teorizou-se que o efeito protetor da deficiência do receptor B1 é dependente da presença de leptina. Análises da fosforilação de STAT3, um fator da cascata ativada pelo receptor de leptina, e de expressão de SOCS3, um inibidor do sinal de Ob-rb, confirmaram as alterações ligadas a esta resistência (MORI *et al.*, 2008).

No trabalho presente tentamos relacionar, através de modelos geneticamente modificados, a função dos receptores de cininas ao metabolismo da glicose, resistência à obesidade e patologias relacionadas. Para isso resolvemos gerar os animais nocautes para os receptores de cininas e deficientes em leptina (*ob/obB2-/-* e *ob/obB1B2-/-*).

Entretanto, os animais *ob/ob* são inférteis. Esta deficiência reprodutiva provém da deficiência do sinal da leptina ao hipotálamo (MANTZOROS, 1999), podendo ser revertida pela administração exógena de leptina, pelo uso de fundos genéticos (backgrounds) específicos ou por restrição alimentar (EWART-TOLAND

et al., 1999). A administração de leptina exógena é cara e inviável para ser usada na manutenção das colônias de *ob/ob*. O uso de camundongos de linhagem diferente restabelece apenas parcialmente a fertilidade dos machos. Esta forma de reversão da infertilidade não é prática para o uso nos biotérios, criando também o problema de não se poder trabalhar com backgrounds desejados a cada experimento. A restauração da fertilidade através da restrição alimentar também é parcial, e por motivos óbvios, esta técnica não é adequada para a manutenção das maternidades, pois teríamos problemas com relação à nutrição dos animais. Portanto, animais magros heterozigotos, portadores da mutação *ob*, são normalmente usados como reprodutores na manutenção das colônias. Esta solução vem sendo usada há muitos anos, mas também gera diversas restrições. Uma delas é a necessidade de selecionar, entre os animais magros, quais são portadores da mutação *ob*. Esta seleção é feita através de genotipagem, já que os animais heterozigotos são fenotipicamente indistinguíveis dos selvagens controles, pois as alterações na sua massa corpórea são sutis. A genotipagem é trabalhosa e cara, envolvendo diversas técnicas de biologia molecular, equipamentos específicos, material caro e mão de obra especializada. Outro empecilho para o uso dos animais heterozigotos como reprodutores é a baixa produção de unidades experimentais. Como a mutação *ob* é recessiva, a cada oito animais gerados apenas dois serão obesos, podendo ser um de cada gênero. Desta forma é necessário criar um enorme número de animais para conseguir grupos homogêneos de animais *ob/ob*. Isso significa que para formar um grupo de machos, 87,5 % dos animais criados serão descartados por não satisfazerem os requisitos genéticos e genéricos para o experimento. Obviamente, parte destes animais poderão ser usados como controles dependendo do desenho do experimento.

Para a geração dos modelos biológicos deste trabalho foi proposto um novo método de criação de animais *ob/ob* utilizando-se o transplante cirúrgico de tecido adiposo e um novo esquema de cruzamentos. Para analisar as vantagens deste novo método, este foi comparado com o sistema tradicional de geração de animais *ob/ob* através de cruzamento com outros animais geneticamente

modificados. Em 2006 foi publicado um trabalho mostrando que o transplante de tecido adiposo restaurava a fertilidade dos camundongos *ob/ob* (SENNELLO *et al.*, 2006). A técnica cirúrgica usada neste trabalho é ligeiramente diferente da descrita por Sennelo, mas segue o mesmo princípio, ou seja, a leptina proveniente do tecido adiposo normal implantado é suficiente para fazer seus efeitos biológicos revertendo os distúrbios metabólicos e restaurando a fertilidade dos animais. O uso de animais irmãos de mesma ninhada é importante para reduzir o risco de rejeição do tecido implantado, pois aumenta a probabilidade de compatibilidade pela diminuição das diferenças genéticas entre os indivíduos.

Para testar o transplante de tecido adiposo, implantamos 300 mg de TAI, proveniente dos irmãos magros, em animais *ob/ob* de três idades diferentes. Com esta quantidade de tecido adiposo os animais apresentaram baixas concentrações de leptina sérica, mas suficientes para corrigir o metabolismo da glicose restabelecendo a sensibilidade à insulina. Este dado mostra a grande sensibilidade dos camundongos *ob/ob* ao hormônio produzido nos adipócitos (SHIMIZU *et al.*, 2007). Os animais *ob/ob* são conhecidos por terem uma severa resistência à insulina, tornando-os hiperglicêmicos. A hiperglicemia destes animais estimula a hipertrofia das ilhotas pancreáticas, as quais passam a produzir e liberar, para a corrente sanguínea, quantidades elevadas de insulina. Os estudos mostram que a insulina sérica dos *ob/ob* pode ser 10 a 20 vezes maior que a dos seus irmãos magros (MUZZIN *et al.*, 1996). A insulina dos animais transplantados foi aferida no soro coletado em diferentes momentos do nosso experimento. Aos 60 dias após o transplante os animais apresentaram níveis séricos de insulina semelhantes a dos seus irmãos magros refletindo a restauração da sensibilidade à insulina. Este efeito pode ser mediado pela ação direta da leptina em seus receptores presentes nas células β pancreáticas inibindo a liberação de insulina o que já foi descrito em alguns trabalhos (KIEFFER *et al.*, 1996; EMILSSON *et al.*, 1997). Apesar do conhecimento do efeito direto inibitório da leptina, nossos dados mostram que este não deve ser o único mecanismo envolvido na diminuição da insulina sérica dos camundongos após o transplante de TA, pois dez dias após o procedimento cirúrgico, já havia

leptina circulante nos animais, mas a concentração de insulina no sangue destes continuava alta. Sabe-se que o principal efeito da leptina é a redução da ingestão de alimentos o que já foi mostrado tanto para a administração de leptina exógena como para o transplante de TA (KLEBANOV *et al.*, 2005). Uma menor ingestão reduz a quantidade de nutrientes absorvidos reduzindo assim os estímulos destes nutrientes à liberação da insulina pelas ilhotas de Langerhans. Este efeito secundário parece ter tido um importante papel na diminuição dos níveis séricos de insulina nos animais transplantados, os quais apresentaram este efeito coincidindo com a perda da massa corpórea.

Após 150 dias do transplante, os tecidos implantados foram retirados cirurgicamente e preparados para histologia. O estudo histológico dos implantes mostrou a presença de vasos funcionais com eritrócitos em sua luz. Esta vascularização parece ter sido eficiente na nutrição das células implantadas, pois o tecido apresentava arquitetura preservada sem sinais de necrose. Estes dados, junto à presença de leptina no sangue dos animais, sugerem que o tecido implantado conseguiu se estabelecer e cumprir com suas funções fisiológicas básicas.

Foram aferidas as massas corpóreas dos diferentes grupos de animais *ob/ob* transplantados. Os grupos operados mais jovens se mantiveram com massa corporal próxima a dos animais normais. O grupo que foi operado já em processo de obesidade, ou seja, já possuía grande aumento na massa corpórea de seus integrantes os quais apresentaram emagrecimento acentuado e se mantiveram abaixo da massa corpórea aferida na curva padrão de ganho de peso (curva de ganho de peso de animais de mesmo genótipo, mantidos nas mesmas condições e que não sofreram cirurgia experimental). Apesar disso se mantiveram acima do peso normal. Este mesmo padrão é observado em pessoas que emagrecem após instalação de obesidade severa. Na obesidade mórbida ocorre tanto a hipertrofia (aumento do volume das células) quanto a hiperplasia (aumento do número de células) do tecido adiposo (NISHIMURA *et al.*, 2007). Após o emagrecimento, o tecido adiposo não sofre aumento na apoptose, mantendo o grande número de adipócitos gerados durante o processo de ganho de peso.

Desta forma o indivíduo continua a possuir uma grande quantidade de tecido adiposo, só que com adipócitos menores. Este tecido residual pode ter influência na tendência ao retorno à obesidade nos pós-obesos. O transplante de tecido adiposo em camundongos *ob/ob* mais velhos pode ser uma ferramenta para estudo do metabolismo em pós-obesos.

Após a retirada dos implantes os grupos voltaram a ganhar peso rapidamente. Isso comprovou que os implantes foram removidos por completo e que as alterações metabólicas são dependentes de um fornecimento contínuo de leptina para o organismo.

Finalmente foram comparados os grupos experimentais com o grupo chamado sham, onde os animais receberam implantes de doadores deficientes para a leptina. O tecido adiposo deficiente para leptina não foi capaz de provocar as alterações metabólicas observadas nos grupos experimentais nem qualquer alteração na massa corpórea dos animais, eliminando assim a possibilidade dos resultados serem provenientes de inflamação causada pela colocação de implantes, como por exemplo, as causadas por processos de rejeição tecidual.

Para o uso dos animais na reprodução, camundongos *ob/ob* de ambos os gêneros foram transplantados com uma quantidade maior de TAI. Para total recuperação da fertilidade, neste trabalho foi implantado 1 g de TAI em cada camundongo (KLEBANOV *et al.*, 2005). Após a recuperação cada macho foi colocado com três fêmeas magras férteis para verificar a atividade reprodutiva destes. As fêmeas foram também colocadas com machos férteis para o mesmo fim. Foram aferidos os intervalos entre partos, número de filhotes por ninhada e duração da atividade reprodutora. Os machos se mostraram férteis por mais de um ano. Alguns ficaram em atividade durante dois anos, o que supera o tempo de vida médio que teriam se não tivessem sido transplantados. Este aumento de longevidade se deve provavelmente à diminuição da glicemia promovida pelo transplante. As fêmeas também se mostraram férteis apesar da maioria ter comido a primeira cria. Apesar destes transtornos comportamentais, a maioria delas foi capaz de criar sete ou mais ninhadas consecutivas, com bom intervalo entre partos, números semelhantes à de uma fêmea magra normal. As fêmeas

transplantadas produziam leite suficiente para alimentar os filhotes sendo capazes de criarem com êxito ao menos 10 filhotes em uma ninhada.

O uso de animais *ob/ob* transplantados facilitou muito a obtenção dos animais duplo mutantes. Já no primeiro cruzamento a genotipagem foi dispensada, pois não houve necessidade de separar os animais de diferentes genótipos entre animais magros da colônia de *ob/ob* uma vez que foi usado um animal homozigoto para a mutação *ob* facilmente identificado pelo seu fenótipo obeso. Em compensação foi necessário fazer o transplante de TA neste animal. Este procedimento, apesar de ser cirúrgico, é muito simples e de fácil execução. A genotipagem é novamente dispensada em F1, pois como os dois progenitores são homozigotos, toda a prole possui o mesmo genótipo sendo possível a utilização de todos os animais para o próximo cruzamento. Este fato aumenta a probabilidade de se obter os fenótipos desejados em F2, pois com um maior número de progenitores nascem mais filhotes nesta geração onde a grande variedade de possibilidades faz com que haja pouca porcentagem de nascimentos de um fenótipo específico. Para a seleção dos progenitores para o novo cruzamento foi feito primeiramente a genotipagem para o receptor de cininas. Esta genotipagem é feita através de uma única PCR utilizando 4 iniciadores na mesma reação. Já a genotipagem para a mutação *ob* requer que o produto da PCR inicial seja digerido com endonuclease de restrição Ddel para nova análise em eletroforese. Apesar de estas técnicas serem rotineiras nos laboratórios, são relativamente caras e sujeitas a artefatos e contaminações. Usando o esquema de cruzamento novo somente 6 fêmeas magras precisaram ser genotipadas para a mutação *ob* contra 93 animais no esquema tradicional. Duas outras vantagens merecem ser destacadas: o reduzido uso de animais para a obtenção de unidades experimentais (93 vs. 217 animais utilizados), e a maior eficiência na ampliação rápida da colônia para fornecimento de animais para experimentos.

Existem várias situações diferentes na experimentação com animais *ob/ob*. A mais antiga é a comparação dos *ob/ob* com os animais magros. Alguns autores defendem que o melhor controle magro para o *ob/ob* é o heterozigoto

OB/ob, pois este tem maior semelhança no seu fundo genético que o *OB/OB*. Neste caso o cruzamento de um *ob/ob* transplantado é mais eficiente na produção dos animais, pois gera 50% de cada genótipo em sua prole. Se for fundamental a utilização do *OB/OB* como controle, o sistema tradicional, com cruzamento de dois heterozigotos será o mais indicado. Outra situação é a comparação de *ob/ob* não tratado com *ob/ob* tratado, como por exemplo, o estudo do treinamento físico nos obesos. Neste caso não há melhor possibilidade do que fazer maternidades homozigotas com machos e fêmeas transplantados, as quais geram 100% de animais experimentais. Os animais transplantados também facilitam a manutenção das colônias nas situações em que não há demanda de animais para experimento, pois basta uma caixa com um macho *ob/ob* transplantado junto a três fêmeas heterozigotas para que haja uma rápida ampliação da colônia. Com este cruzamento a genotipagem é totalmente desnecessária e mesmo que se opte pelo sistema tradicional, os reprodutores estarão disponíveis pela simples seleção visual do fenótipo magro.

Com relação à experimentação com animais duplo mutantes deficientes em leptina, o grupo controle deve ser formado por animais *ob/ob* sem a segunda mutação. Estes experimentos são feitos sempre somente com animais obesos. Neste caso a geração de 75% de animais magros através do sistema tradicional não só é um desperdício, mas passa a ser motivo de discussão nos comitês de ética, uma vez que se toma o conhecimento do novo método proposto com o qual é possível produzir os animais experimentais de forma mais eficiente e com ninhadas 100% obesas. Outra consideração importante no uso destes animais com mutações combinadas através de cruzamentos é o uso de animais nocaute para a segunda modificação genética. A técnica de geração de camundongos nocautes implica na produção inicial de um animal quimérico. Apesar deste animal possuir células de dois fundos genéticos diferentes, ele só transmitirá a mutação caso tenha suas gônadas formadas por uma célula mutada. Isso implica que sua prole sempre carregará o mesmo fundo genético da célula transformada. Se o animal quimérico for cruzado com outro quimérico ou com outro de mesmo fundo genético que o das células transformadas será mantido o fundo genético

original. Outros cruzamentos podem gerar animais de fundo genético misto e geralmente são os preferidos, porque as células usadas para transformação são geralmente de um único fundo genético chamado 129/SV. Além disso, após obtidos os animais nocaute, estas colônias costumam ser mantidas em homozigose por muitas gerações, o que propicia um afastamento genético com a colônia original controle. Isso implica que na experimentação com animais contendo mutações combinadas o ideal é usar animais de diferentes genótipos nascidos na mesma ninhada, ou seja, obter os animais controle irmãos dos animais experimentais. Para este ideal, no caso de animais deficientes para leptina, o melhor cruzamento consiste em animais obesos transplantados, heterozigotos para a segunda mutação. Este cruzamento gerará 50% de animais experimentais sendo metade deles de cada genótipo. Se a mutação adicional for recessiva e/ou os animais heterozigotos sejam reconhecidos como controles ideais, o melhor cruzamento passa a ser o de um *ob/ob* transplantado heterozigoto para a segunda mutação junto a um duplo mutante homozigoto, gerando 50% de cada genótipo desejado. Cruzamentos utilizando o transplante de TA são muito vantajosos quando a segunda mutação tem caráter dominante, como no caso do cruzamento dos *ob/ob* com animais possuindo proteína com fluorescência verde (Green Fluorescence Protein – GFP Mice). O cruzamento do progenitor macho *ob/ob* transplantado com suas filhas duplo heterozigotas gera 25% de cada fenótipo na mesma ninhada: gordos (50%) normais e verdes (25% cada), e magros normais e verdes (*idem*).

Com o uso do transplante de tecido adiposo foram gerados dois novos modelos experimentais: o *ob/obB2^{-/-}* e o *ob/obB1B2^{-/-}*. O genótipo dos animais foi confirmado pela genotipagem. Além disso, foi verificado se eles realmente não possuíam os receptores de cininas expressos nos seus tecidos através de ensaio de contração de músculo liso de estômago. Os receptores são conhecidos por serem expressos constitutivamente neste tecido e por provocarem a contração do órgão quando estimulados com cininas (BARBOSA *et al.*, 2006). Uma vez confirmada a ausência dos receptores nos animais gerados iniciou-se a caracterização básica destes animais. O acompanhamento do desenvolvimento

corpóreo dos nocautes mostrou que a deficiência dos receptores de cininas não alterou o fenótipo obeso dos animais *ob/ob*. Os animais apresentaram crescimento semelhante com pequenas variações confirmadas nas fêmeas *ob/obB2^{-/-}* que se mostraram um pouco mais pesadas que as controle. Este aumento de peso não foi acompanhado pelo aumento do tecido adiposo. Este aumento de massa corpórea nestes animais está ligada ao aumento da massa magra ou óssea. A mesma tendência foi verificada nos machos, mas sem significância estatística. A mesma observação foi feita com relação aos animais *ob/obB1^{-/-}*. Estes animais também apresentavam obesidade similar a dos controles apesar da deficiência do receptor B1 proteger os animais normais para o gene da leptina contra obesidade quando submetidos à dieta hiperlipídica (MORI *et al.*, 2008). Estes autores mostraram que o receptor B1 de cininas pode estar ligado ao desenvolvimento de resistência à leptina. Da mesma forma os receptores B2 podem estar ligados a mecanismos regulatórios de outros sistemas metabólicos o que torna os animais gerados candidatos como ferramentas úteis no estudo destes sistemas.

Ao analisar as massas relativas dos órgãos foram notadas algumas diferenças entre os genótipos como: hepatomegalia nas fêmeas *ob/obB1B2^{-/-}* quando comparadas aos outros dois fenótipos; pâncreas reduzido nestas fêmeas; maior massa no baço dos machos *ob/obB1B2^{-/-}* e algumas variações nas massas do coração entre os genótipos. Estas alterações acompanham a menor deposição de TA abdominal em ambos os gêneros dos animais *ob/obB1B2^{-/-}*. Algumas destas alterações acompanham o que foi observado nos animais nocaute apenas para os receptores de cininas. Os nocautes para receptor B2 mostraram ter tendência a hipertrofia cardíaca (BATISTA *et al.*, 2008). Os animais deficientes para a leptina já possuem uma hipertrofia cardíaca muito acentuada aos seis meses de idade tendo a massa do ventrículo esquerdo 50% maior que dos controles magros (BAROUCH *et al.*, 2003). O efeito da deficiência dos receptores de cininas pode estar minimizado diante de tamanha alteração morfológica, mas pode ser revelada com desafios como o exercício físico e o treinamento. Os

modelos gerados neste trabalho serão úteis na verificação da inter-relação entre a deficiência de cininas e de leptina na fisiologia cardíaca.

A diferente distribuição de tecido adiposo e o aumento do tamanho do fígado das fêmeas *ob/obB1B2^{-/-}* podem estar ligados aos resultados obtidos nas análises glicêmicas neste trabalho. Já está bem descrito que os animais *ob/ob* apresentam uma marcante resistência à insulina, desde as primeiras semanas de idade, e que desenvolvem hiperglicemia uma ou duas semanas depois. Esta tendência irá permanecer até alcançarem idade próxima de 20 semanas, quando a enorme quantidade de insulina liberada por ilhotas 10 vezes maiores que dos animais magros, consegue compensar parcialmente insensibilidade à insulina e reduzir os níveis glicêmicos até próximo ao normal (LINDSTROM, 2007). Nos testes de tolerância à glicose (TTG) realizados aos 3 e 6 meses de idade foi notada clara diferença entre os genótipos. Aos 3 meses de idade os animais gerados mostraram ter semelhante capacidade de captação de glicose que os controles *ob/ob*. Quando avaliados com 26 semanas de idade os resultados não são os mesmos. Tanto machos como fêmeas do grupo *ob/ob* aumentam a tolerância à glicose. No grupo *ob/obB2^{-/-}* esta maior captação não acontece. Os machos *ob/obB1B2^{-/-}* também mantêm a tolerância à glicose mas as fêmeas *ob/obB1B2^{-/-}* apresentaram aumento da hiperglicemia e diminuição da captação da glicose no teste de tolerância. Isso pode estar refletindo na alteração morfológica hepática observada nestas fêmeas, o que deverá ser analisado posteriormente. Os machos de mesmo fenótipo conseguiram manter a tolerância à glicose diferentemente das fêmeas. O teste de resistência à insulina mostrou que tanto os machos quanto as fêmeas *ob/obB1B2^{-/-}* possuem maior resistência que os outros dois genótipos. Estes dados fizeram com que fosse gerada uma pergunta referente à diferença entre machos e fêmeas no que se refere à tolerância da glicose nestes animais. Ao examinarmos a insulina sérica dos grupos verificamos que os machos *ob/obB1B2^{-/-}* possuíam concentrações de insulina muito maiores que a dos outros grupos. A média de insulina sérica dos machos *ob/obB1B2^{-/-}* aos 6 meses de idade é duas vezes maior que a das fêmeas de mesmo genótipo. Os machos conseguiram aumentar a produção de

insulina em quantidade suficiente para compensar a maior resistência provocada pela falta de receptores B1 e B2 de cininas, e as fêmeas não foram capazes até esta idade. O pâncreas destas fêmeas era significativamente menor que o dos animais controle, o que pode estar ligado a esta incapacidade de aumentar a liberação deste hormônio hipoglicemiante.

A relação entre a resposta das células beta pancreáticas e da resistência à insulina determina a glicemia no organismo (KAHN *et al.*, 2006). O aumento de resistência à insulina ocorre de forma fisiológica em diversas circunstâncias como na gestação e na puberdade (BUCHANAN *et al.*, 1990; MORAN *et al.*, 1999). Este aumento está presente também na obesidade (KAHN e FLIER, 2000). O fato de o indivíduo ser obeso não significa que ele irá desenvolver hiperglicemia ou diabetes tipo 2. Isso só ocorre se não houver uma adequada resposta das ilhotas pancreáticas em aumentar a liberação de insulina diante do aumento da resistência à insulina causada pela obesidade. A diabetes tipo 2 é caracterizada por hiperglicemia resultante da incapacidade das ilhotas pancreáticas de suprir a elevada demanda de insulina diante de um organismo resistente a este hormônio (KAHN *et al.*, 2006). Por outro lado, o glucagon tem sido descrito como importante hormônio na manutenção da glicemia em animais modelos de diabetes (SORENSEN *et al.*, 2006). Outros estudos mostram que o receptor B2 de cininas está envolvido na liberação de glucagon pelo pâncreas assim como também a bradicinina estimula a liberação de insulina nas ilhotas pancreáticas (ABU-BASHA *et al.*, 2000). Desta forma, falta dos receptores de cininas influencia diretamente na liberação destes hormônios, o que posteriormente poderá ser estudado nos animais gerados para entender a participação do SCC no controle da liberação dos hormônios pancreáticos na obesidade severa. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de diabetes tipo 2 não estão completamente elucidados, mas existe o consenso que estão ligados a diversos fatores inclusive a múltiplos fatores genéticos (MCCARTHY, 2004). Os camundongos gerados neste trabalho poderão ajudar a elucidar estes mecanismos e o papel dos receptores de cininas na diabetes tipo 2. A técnica de transplante de tecido adiposo facilita o cruzamento dos animais *ob/ob* com outros modelos mutantes facilitando a

geração de ferramentas para o estudo de genes envolvidos na obesidade e nas doenças relacionadas a esta condição.

6 Conclusões e Sugestões

O uso do transplante de tecido adiposo facilita a geração e manutenção de colônias de camundongos deficientes para leptina, aumenta a capacidade de ampliação rápida das colônias e reduz custos e desperdícios de animais nas criações.

A partir da técnica acima descrita, os animais deficientes para leptina e receptores de cininas foram gerados (*ob/obB2^{-/-}* e *ob/obB1B2^{-/-}*).

Os animais *ob/ob* nocautes para os receptores de cininas apresentam fenótipos diferentes de seus controles podendo ser usados para elucidar a influência do sistema caliceína-cininas na obesidade mórbida e o comportamento fisiológico deste sistema na ausência de leptina.

A deficiência de ambos receptores de cininas em animais *ob/ob* aumenta a resistência à insulina e reduz a captação de glicose. Estas alterações são parcialmente compensadas nos machos que aumentam a liberação de insulina, o que não ocorre nas fêmeas, que continuam hiperglicêmicas durante toda a vida.

7 Referências

- ABE, K. C., MORI, M. A. e PESQUERO, J. B. Leptin deficiency leads to the regulation of kinin receptors expression in mice. **Regul Pept**, v.138, n.2-3, Feb 1, p.56-8. 2007.
- ABRANTES, M. M., LAMOUNIER, J. A. e COLOSIMO, E. A. [Overweight and obesity prevalence in Northeast and Southeast Regions of Brazil]. **Rev Assoc Med Bras**, v.49, n.2, Apr-Jun, p.162-6. 2003.
- ABU-BASHA, E. A., MAKOWSKI, J. P., YIBCHOK-ANUN, S. e HSU, W. H. Stimulatory effect of bradykinin (BK) on glucagon secretion from the perfused rat pancreas: involvement of BK2 receptors. **Metabolism**, v.49, n.10, Oct, p.1370-3. 2000.
- ALBERTI, K. G., ZIMMET, P. e SHAW, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. **Lancet**, v.366, n.9491, Sep 24-30, p.1059-62. 2005.
- ALFIE, M. E., SIGMON, D. H., POMPOSIELLO, S. I. e CARRETERO, O. A. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. **Hypertension**, v.29, n.1 Pt 2, Jan, p.483-7. 1997.
- ARAUJO, R. C., KETTRITZ, R., FICHTNER, I., PAIVA, A. C., PESQUERO, J. B. e BADER, M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. **Biol Chem**, v.382, n.1, Jan, p.91-5. 2001.
- ARAUJO, R. C., MORI, M. A., MERINO, V. F., BASCANDS, J. L., SCHANSTRA, J. P., ZOLLNER, R. L., VILLELA, C. A., NAKAIE, C. R., PAIVA, A. C., PESQUERO, J. L., BADER, M. e PESQUERO, J. B. Role of the kinin B1

receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. **Biol Chem**, v.387, n.4, Apr, p.431-6. 2006.

ARVANITI, K., HUANG, Q. e RICHARD, D. Effects of leptin and corticosterone on the expression of corticotropin-releasing hormone, agouti-related protein, and proopiomelanocortin in the brain of ob/ob mouse. **Neuroendocrinology**, v.73, n.4, Apr, p.227-36. 2001.

BADO, A., LEVASSEUR, S., ATTOUB, S., KERMORGANT, S., LAIGNEAU, J. P., BORTOLUZZI, M. N., MOIZO, L., LEHY, T., GUERRE-MILLO, M., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. e LEWIN, M. J. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v.394, n.6695, Aug 20, p.790-3. 1998.

BARASH, I. A., CHEUNG, C. C., WEIGLE, D. S., REN, H., KABIGTING, E. B., KUIJPER, J. L., CLIFTON, D. K. e STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v.137, n.7, Jul, p.3144-7. 1996.

BARBOSA, A. M., FELIPE, S. A., PESQUERO, J. B., PAIVA, A. C. e SHIMUTA, S. I. Disruption of the kinin B1 receptor gene affects potentiating effect of captopril on BK-induced contraction in mice stomach fundus. **Peptides**, v.27, n.12, Dec, p.3377-82. 2006.

BARIOHAY, B., LEBRUN, B., MOYSE, E. e JEAN, A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. **Endocrinology**, v.146, n.12, Dec, p.5612-20. 2005.

BAROUCH, L. A., BERKOWITZ, D. E., HARRISON, R. W., O'DONNELL, C. P. e HARE, J. M. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. **Circulation**, v.108, n.6, Aug 12, p.754-9. 2003.

- BATISTA, E. C., BATISTA, E. C., RAMALHO, J. D., REIS, F. C., BARROS, C. C., MORAES, M. R., PESQUERO, J. L., BACURAU, R. F., PESQUERO, J. B. e ARAUJO, R. C. Swimming training exacerbates pathological cardiac hypertrophy in kinin B(2) receptor-deficient mice. **Int Immunopharmacol**, v.8, n.2, Feb, p.271-5. 2008.
- BEARD, K. M., LU, H., HO, K. e FANTUS, I. G. Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH2-terminal kinase. **Diabetes**, v.55, n.10, Oct, p.2678-87. 2006.
- BELLISARI, A. Evolutionary origins of obesity. **Obes Rev**, v.9, n.2, Mar, p.165-80. 2008.
- BHoola, K. D., FIGUEROA, C. D. e WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**, v.44, n.1, Mar, p.1-80. 1992.
- BILLINGTON, C. J., BRIGGS, J. E., GRACE, M. e LEVINE, A. S. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. **Am J Physiol**, v.260, n.2 Pt 2, Feb, p.R321-7. 1991.
- BINA, K. G. e CINCOTTA, A. H. Dopaminergic agonists normalize elevated hypothalamic neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone, body weight gain, and hyperglycemia in ob/ob mice. **Neuroendocrinology**, v.71, n.1, Jan, p.68-78. 2000.
- BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v.46, n.1, Jan, p.3-10. 1997.

- BORKOWSKI, J. A., RANSOM, R. W., SEABROOK, G. R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R. G., STRADER, C. D. e HESS, J. F. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **J Biol Chem**, v.270, n.23, Jun 9, p.13706-10. 1995.
- BROCKMANN, G. A. e BEVOVA, M. R. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. **Trends Genet**, v.18, n.7, Jul, p.367-76. 2002.
- BUCHANAN, T. A., METZGER, B. E., FREINKEL, N. e BERGMAN, R. N. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, v.162, n.4, Apr, p.1008-14. 1990.
- BULTMAN, S. J., MICHAUD, E. J. e WOYCHIK, R. P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. **Cell**, v.71, n.7, Dec 24, p.1195-204. 1992.
- BURCH, R. M. e KYLE, D. J. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. **Life Sci**, v.50, n.12, p.829-38. 1992.
- BURGUERA, B., COUCE, M. E., LONG, J., LAMSAM, J., LAAKSO, K., JENSEN, M. D., PARISI, J. E. e LLOYD, R. V. The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. **Neuroendocrinology**, v.71, n.3, Mar, p.187-95. 2000.
- BUSE, M. G., ROBINSON, K. A., GETTYS, T. W., MCMAHON, E. G. e GULVE, E. A. Increased activity of the hexosamine synthesis pathway in muscles of insulin-resistant ob/ob mice. **Am J Physiol**, v.272, n.6 Pt 1, Jun, p.E1080-8. 1997.

- CALZA, S., DECARLI, A. e FERRARONI, M. Obesity and prevalence of chronic diseases in the 1999-2000 Italian National Health Survey. **BMC Public Health**, v.8, p.140. 2008.
- CAMPFIELD, L. A., SMITH, F. J. e BURN, P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Horm Metab Res**, v.28, n.12, Dec, p.619-32. 1996.
- CASABIELL, X., PINEIRO, V., TOME, M. A., PEINO, R., DIEGUEZ, C. e CASANUEVA, F. F. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.12, Dec, p.4270-3. 1997.
- CASTELLUCCI, M., DE MATTEIS, R., MEISSER, A., CANCELLO, R., MONSURRO, V., ISLAMI, D., SARZANI, R., MARZIONI, D., CINTI, S. e BISCHOF, P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. **Mol Hum Reprod**, v.6, n.10, Oct, p.951-8. 2000.
- CAYLA, C., TODIRAS, M., ILIESCU, R., SAUL, V. V., GROSS, V., PILZ, B., CHAI, G., MERINO, V. F., PESQUERO, J. B., BALATU, O. C. e BADER, M. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. **Faseb J**, v.21, n.8, Jun, p.1689-98. 2007.
- CHARLTON, H. M. Mouse mutants as models in endocrine research. **Q J Exp Physiol**, v.69, n.4, Oct, p.655-76. 1984.
- CHEN, M., BERGMAN, R. N. e PORTE, D., JR. Insulin resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. **J Clin Endocrinol Metab**, v.67, n.5, Nov, p.951-7. 1988.

CHRISTOPHER, J., VELARDE, V., ZHANG, D., MAYFIELD, D., MAYFIELD, R. K. e JAFFA, A. A. Regulation of B(2)-kinin receptors by glucose in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.280, n.4, Apr, p.H1537-46. 2001.

CHUNG, W. K., POWER-KEHOE, L., CHUA, M. e LEIBEL, R. L. Mapping of the OB receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. **Genome Res**, v.6, n.5, May, p.431-8. 1996.

CLEMENT, K. e FERRE, P. Genetics and the pathophysiology of obesity. **Pediatr Res**, v.53, n.5, May, p.721-5. 2003.

COLEMAN, D. L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, v.9, n.4, Aug, p.294-8. 1973.

CONE, R. D., LU, D., KOPPULA, S., VAGE, D. I., KLUNGLAND, H., BOSTON, B., CHEN, W., ORTH, D. N., POUTON, C. e KESTERSON, R. A. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. **Recent Prog Horm Res**, v.51, p.287-317; discussion 318. 1996.

CONSIDINE, R. V., CONSIDINE, E. L., WILLIAMS, C. J., HYDE, T. M. e CARO, J. F. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. **Diabetes**, v.45, n.7, Jul, p.992-4. 1996.

COWLEY, M. A., SMITH, R. G., DIANO, S., TSCHOP, M., PRONCHUK, N., GROVE, K. L., STRASBURGER, C. J., BIDLINGMAIER, M., ESTERMAN, M., HEIMAN, M. L., GARCIA-SEGURA, L. M., NILLNI, E. A., MENDEZ, P., LOW, M. J., SOTONYI, P., FRIEDMAN, J. M., LIU, H., PINTO, S., COLMERS, W. F., CONE, R. D. e HORVATH, T. L. The distribution and

mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron**, v.37, n.4, Feb 20, p.649-61. 2003.

CUNNINGHAM, M. J., CLIFTON, D. K. e STEINER, R. A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol Reprod**, v.60, n.2, Feb, p.216-22. 1999.

DAHLMAN, I. e ARNER, P. Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue. **Int J Obes (Lond)**, v.31, n.11, Nov, p.1629-41. 2007.

DANDONA, P., ALJADA, A. e BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol**, v.25, n.1, Jan, p.4-7. 2004.

DEFRONZO, R. A. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. **Diabetes**, v.28, n.12, Dec, p.1095-101. 1979.

DENTIN, R., BENHAMED, F., HAINAULT, I., FAUVEAU, V., FOUFELLE, F., DYCK, J. R., GIRARD, J. e POSTIC, C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. **Diabetes**, v.55, n.8, Aug, p.2159-70. 2006.

DRAY, A. e PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**, v.16, n.3, Mar, p.99-104. 1993.

DUBUC, P. U. Effects of phenotype, feeding condition and cold exposure on thyrotropin and thyroid hormones of obese and lean mice. **Endocr Regul**, v.25, n.3, Sep, p.171-5. 1991.

- DUBUC, P. U., MOBLEY, P. W., MAHLER, R. J. e ENSINCK, J. W. Immunoreactive glucagon levels in obese-hyperglycemic (ob/ob) mice. **Diabetes**, v.26, n.9, Sep, p.841-6. 1977.
- DUKA, I., SHENOUDA, S., JOHNS, C., KINTSURASHVILI, E., GAVRAS, I. e GAVRAS, H. Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. **Hypertension**, v.38, n.6, Dec 1, p.1355-60. 2001.
- EDVARDSSON, U., VON LOWENHIELM, H. B., PANFILOV, O., NYSTROM, A. C., NILSSON, F. e DAHLLOF, B. Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. **Proteomics**, v.3, n.4, Apr, p.468-78. 2003.
- EDVELL, A. e LINDSTROM, P. Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umea ob/ob). **Metabolism**, v.44, n.7, Jul, p.906-13. 1995.
- _____. Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice (Umea +/-). **Endocrinology**, v.140, n.2, Feb, p.778-83. 1999.
- EMANUELI, C., MAESTRI, R., CORRADI, D., MARCHIONE, R., MINASI, A., TOZZI, M. G., SALIS, M. B., STRAINO, S., CAPOGROSSI, M. C., OLIVETTI, G. e MADEDDU, P. Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. **Circulation**, v.100, n.23, Dec 7, p.2359-65. 1999.
- EMILSSON, V., LIU, Y. L., CAWTHORNE, M. A., MORTON, N. M. e DAVENPORT, M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. **Diabetes**, v.46, n.2, Feb, p.313-6. 1997.

- EWART-TOLAND, A., MOUNZIH, K., QIU, J. e CHEHAB, F. F. Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. **Endocrinology**, v.140, n.2, Feb, p.732-8. 1999.
- FAGGIONI, R., FULLER, J., MOSER, A., FEINGOLD, K. R. e GRUNFELD, C. LPS-induced anorexia in leptin-deficient (ob/ob) and leptin receptor-deficient (db/db) mice. **Am J Physiol**, v.273, n.1 Pt 2, Jul, p.R181-6. 1997.
- FAIN, J. N., MADAN, A. K., HILER, M. L., CHEEMA, P. e BAHOUTH, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v.145, n.5, May, p.2273-82. 2004.
- FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v.115, n.5, May, p.911-9; quiz 920. 2005.
- FANTUZZI, G. e FAGGIONI, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. **J Leukoc Biol**, v.68, n.4, Oct, p.437-46. 2000.
- FAROOQI, I. S., KEOGH, J. M., KAMATH, S., JONES, S., GIBSON, W. T., TRUSSELL, R., JEBB, S. A., LIP, G. Y. e O'RAHILLY, S. Partial leptin deficiency and human adiposity. **Nature**, v.414, n.6859, Nov 1, p.34-5. 2001.
- FEINSTEIN, R., KANETY, H., PAPA, M. Z., LUNENFELD, B. e KARASIK, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J Biol Chem**, v.268, n.35, Dec 15, p.26055-8. 1993.
- FERNANDEZ-REAL, J. M. e RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocr Rev**, v.24, n.3, Jun, p.278-301. 2003.

- FLEGAL, K. M., CARROLL, M. D., OGDEN, C. L. e JOHNSON, C. L. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **Jama**, v.288, n.14, Oct 9, p.1723-7. 2002.
- FLEGAL, K. M., GRAUBARD, B. I., WILLIAMSON, D. F. e GAIL, M. H. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. **Jama**, v.293, n.15, Apr 20, p.1861-7. 2005.
- FORTIN, J. P. e MARCEAU, F. Advances in the development of bradykinin receptor ligands. **Curr Top Med Chem**, v.6, n.13, p.1353-63. 2006.
- FOSTER, D. L. e NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biol Reprod**, v.60, n.2, Feb, p.205-15. 1999.
- FREDERICH, R. C., LOLLMANN, B., HAMANN, A., NAPOLITANO-ROSEN, A., KAHN, B. B., LOWELL, B. B. e FLIER, J. S. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. **J Clin Invest**, v.96, n.3, Sep, p.1658-63. 1995.
- GARTHWAITE, T. L., MARTINSON, D. R., TSENG, L. F., HAGEN, T. C. e MENAHAN, L. A. A longitudinal hormonal profile of the genetically obese mouse. **Endocrinology**, v.107, n.3, Sep, p.671-6. 1980.
- GASTALDELLI, A., BALDI, S., PETTITI, M., TOSCHI, E., CAMASTRA, S., NATALI, A., LANDAU, B. R. e FERRANNINI, E. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. **Diabetes**, v.49, n.8, Aug, p.1367-73. 2000.

- GEPTS, W., CHRISTOPHE, J. e MAYER, J. Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome: lack of effect of carbutamide. **Diabetes**, v.9, Jan-Feb, p.63-9. 1960.
- GETTYS, T. W., WATSON, P. M., TAYLOR, I. L. e COLLINS, S. RU-486 (Mifepristone) ameliorates diabetes but does not correct deficient beta-adrenergic signalling in adipocytes from mature C57BL/6J-ob/ob mice. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.21, n.10, Oct, p.865-73. 1997.
- GIACOMELLI, F. e WIENER, J. Primary myocardial disease in the diabetic mouse. An ultrastructural study. **Lab Invest**, v.40, n.4, Apr, p.460-73. 1979.
- GOLDEN, P. L., MACCAGNAN, T. J. e PARDRIDGE, W. M. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. **J Clin Invest**, v.99, n.1, Jan 1, p.14-8. 1997.
- GONG, D. W., BI, S., PRATLEY, R. E. e WEINTRAUB, B. D. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. **J Biol Chem**, v.271, n.8, Feb 23, p.3971-4. 1996.
- GONZALEZ, R. R., SIMON, C., CABALLERO-CAMPO, P., NORMAN, R., CHARDONNENS, D., DEVOTO, L. e BISCHOF, P. Leptin and reproduction. **Hum Reprod Update**, v.6, n.3, May-Jun, p.290-300. 2000.
- GOODYEAR, L. J. e KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annu Rev Med**, v.49, p.235-61. 1998.
- GREGOIRE, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.226, n.11, Dec, p.997-1002. 2001.

HALAAS, J. L., GAJIWALA, K. S., MAFFEI, M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T., RABINOWITZ, D., LALLONE, R. L., BURLEY, S. K. e FRIEDMAN, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v.269, n.5223, Jul 28, p.543-6. 1995.

HALUZIK, M., COLOMBO, C., GAVRILOVA, O., CHUA, S., WOLF, N., CHEN, M., STANNARD, B., DIETZ, K. R., LE ROITH, D. e REITMAN, M. L. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. **Endocrinology**, v.145, n.7, Jul, p.3258-64. 2004.

HANSEN, E. S. e KNUDSEN, J. Continuous flow microcalorimetric measurement of heat production in white adipose tissue from obese (ob/ob) mice and their lean littermates. **Biochim Biophys Acta**, v.721, n.4, Dec 30, p.418-24. 1982.

HARRIS, R. B., ZHOU, J., REDMANN, S. M., JR., SMAGIN, G. N., SMITH, S. R., RODGERS, E. e ZACHWIEJA, J. J. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. **Endocrinology**, v.139, n.1, Jan, p.8-19. 1998.

HEGYI, K., FULOP, K., KOVACS, K., TOTH, S. e FALUS, A. Leptin-induced signal transduction pathways. **Cell Biol Int**, v.28, n.3, p.159-69. 2004.

HERBERG, L., MAJOR, E., HENNIGS, U., GRUNEKLEE, D., FREYTAG, G. e GRIES, F. A. Differences in the development of the obese-hyperglycemic syndrome in obob and NZO mice. **Diabetologia**, v.6, n.3, Jun, p.292-9. 1970.

HICKEY, M. S., HOUMARD, J. A., CONSIDINE, R. V., TYNDALL, G. L., MIDGETTE, J. B., GAVIGAN, K. E., WEIDNER, M. L., MCCAMMON, M. R., ISRAEL, R. G. e CARO, J. F. Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. **Am J Physiol**, v.272, n.4 Pt 1, Apr, p.E562-6. 1997.

- HOFBAUER, K. G. Molecular pathways to obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.26 Suppl 2, Sep, p.S18-27. 2002.
- HOGGARD, N., HUNTER, L., DUNCAN, J. S., WILLIAMS, L. M., TRAYHURN, P. e MERCER, J. G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.20, Sep 30, p.11073-8. 1997.
- HORVATH, T. L., DIANO, S. e VAN DEN POL, A. N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. **J Neurosci**, v.19, n.3, Feb 1, p.1072-87. 1999.
- HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. e SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.259, n.5091, Jan 1, p.87-91. 1993.
- INGALLS, A. M., DICKIE, M. M. e SNELL, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. **J Hered**, v.41, n.12, Dec, p.317-8. 1950.
- ISSE, N., OGAWA, Y., TAMURA, N., MASUZAKI, H., MORI, K., OKAZAKI, T., SATOH, N., SHIGEMOTO, M., YOSHIMASA, Y., NISHI, S. e ET AL. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. **J Biol Chem**, v.270, n.46, Nov 17, p.27728-33. 1995.
- JEON, J. Y., STEADWARD, R. D., WHEELER, G. D., BELL, G., MCCARGAR, L. e HARBER, V. Intact sympathetic nervous system is required for leptin effects on resting metabolic rate in people with spinal cord injury. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.1, Jan, p.402-7. 2003.

- JOLLY, S. R., HRON, W. T., LECH, J. J. e MENAHAN, L. A. Glycerokinase activity and triacylglycerol content in hearts of genetically obese hyperglycemic (ob/ob) mice. **Horm Metab Res**, v.10, n.2, Mar, p.172. 1978.
- JORGENSEN, J. O., VAHL, N., DALL, R. e CHRISTIANSEN, J. S. Resting metabolic rate in healthy adults: relation to growth hormone status and leptin levels. **Metabolism**, v.47, n.9, Sep, p.1134-9. 1998.
- KADOWAKI, T., YAMAUCHI, T., KUBOTA, N., HARA, K., UEKI, K. e TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v.116, n.7, Jul, p.1784-92. 2006.
- KAHN, B. B. e FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v.106, n.4, Aug, p.473-81. 2000.
- KAHN, S. E. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.9, Sep, p.4047-58. 2001.
- KAHN, S. E., HULL, R. L. e UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.840-6. 2006.
- KAHN, S. E., PRIGEON, R. L., MCCULLOCH, D. K., BOYKO, E. J., BERGMAN, R. N., SCHWARTZ, M. W., NEIFING, J. L., WARD, W. K., BEARD, J. C., PALMER, J. P. e ET AL. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. **Diabetes**, v.42, n.11, Nov, p.1663-72. 1993.

- KAKUMA, T., WANG, Z. W., PAN, W., UNGER, R. H. e ZHOU, Y. T. Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. **Endocrinology**, v.141, n.12, Dec, p.4576-82. 2000.
- KANDA, H., TATEYA, S., TAMORI, Y., KOTANI, K., HIASA, K., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MIYACHI, H., MAEDA, S., EGASHIRA, K. e KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v.116, n.6, Jun, p.1494-505. 2006.
- KARSENTY, G. Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay. **Recent Prog Horm Res**, v.56, p.401-15. 2001.
- KEESEY, R. E. e HIRVONEN, M. D. Body weight set-points: determination and adjustment. **J Nutr**, v.127, n.9, Sep, p.1875S-1883S. 1997.
- KELLER, P., KELLER, C., STEENSBERG, A., ROBINSON, L. E. e PEDERSEN, B. K. Leptin gene expression and systemic levels in healthy men: effect of exercise, carbohydrate, interleukin-6, and epinephrine. **J Appl Physiol**, v.98, n.5, May, p.1805-12. 2005.
- KENNEDY, A., GETTYS, T. W., WATSON, P., WALLACE, P., GANAWAY, E., PAN, Q. e GARVEY, W. T. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.4, Apr, p.1293-300. 1997.
- KIEFFER, T. J., HELLER, R. S. e HABENER, J. F. Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.224, n.2, Jul 16, p.522-7. 1996.

KIM, S. P., ELLMERER, M., VAN CITTERS, G. W. e BERGMAN, R. N. Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. **Diabetes**, v.52, n.10, Oct, p.2453-60. 2003.

KISHI, K., MUROMOTO, N., NAKAYA, Y., MIYATA, I., HAGI, A., HAYASHI, H. e EBINA, Y. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. **Diabetes**, v.47, n.4, Apr, p.550-8. 1998.

KLEBANOV, S., ASTLE, C. M., DESIMONE, O., ABLAMUNITZ, V. e HARRISON, D. E. Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. **J Endocrinol**, v.186, n.1, Jul, p.203-11. 2005.

KLEBIG, M. L., WILKINSON, J. E., GEISLER, J. G. e WOYCHIK, R. P. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.11, May 23, p.4728-32. 1995.

KLEYN, P. W., FAN, W., KOVATS, S. G., LEE, J. J., PULIDO, J. C., WU, Y., BERKEMEIER, L. R., MISUMI, D. J., HOLMGREN, L., CHARLAT, O., WOOLF, E. A., TAYBER, O., BRODY, T., SHU, P., HAWKINS, F., KENNEDY, B., BALDINI, L., EBELING, C., ALPERIN, G. D., DEEDS, J., LAKEY, N. D., CULPEPPER, J., CHEN, H., GLUCKSMANN-KUIS, M. A., CARLSON, G. A., DUYK, G. M. e MOORE, K. J. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. **Cell**, v.85, n.2, Apr 19, p.281-90. 1996.

KOLACZYNSKI, J. W., CONSIDINE, R. V., OHANNESIAN, J., MARCO, C., OPENTANOVA, I., NYCE, M. R., MYINT, M. e CARO, J. F. Responses of

leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. **Diabetes**, v.45, n.11, Nov, p.1511-5. 1996.

KOLACZYNSKI, J. W., OHANNESIAN, J. P., CONSIDINE, R. V., MARCO, C. C. e CARO, J. F. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.11, Nov, p.4162-5. 1996.

KORBONITS, M., TRAINER, P. J., LITTLE, J. A., EDWARDS, R., KOPELMAN, P. G., BESSER, G. M., SVEC, F. e GROSSMAN, A. B. Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.46, n.6, Jun, p.751-7. 1997.

KRISTENSEN, P., JUDGE, M. E., THIM, L., RIBEL, U., CHRISTJANSEN, K. N., WULFF, B. S., CLAUSEN, J. T., JENSEN, P. B., MADSEN, O. D., VRANG, N., LARSEN, P. J. e HASTRUP, S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v.393, n.6680, May 7, p.72-6. 1998.

KUMANO, S., MATSUMOTO, H., TAKATSU, Y., NOGUCHI, J., KITADA, C. e OHTAKI, T. Changes in hypothalamic expression levels of galanin-like peptide in rat and mouse models support that it is a leptin-target peptide. **Endocrinology**, v.144, n.6, Jun, p.2634-43. 2003.

KWON, H. Y., BULTMAN, S. J., LOFFLER, C., CHEN, W. J., FURDON, P. J., POWELL, J. G., USALA, A. L., WILKISON, W., HANSMANN, I. e WOYCHIK, R. P. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.21, Oct 11, p.9760-4. 1994.

- LALONDE, J., SAMSON, P., POULIN, S., DESHAIES, Y. e RICHARD, D. Additive effects of leptin and topiramate in reducing fat deposition in lean and obese ob/ob mice. **Physiol Behav**, v.80, n.4, Jan, p.415-20. 2004.
- LAM, Q. L. e LU, L. Role of leptin in immunity. **Cell Mol Immunol**, v.4, n.1, Feb, p.1-13. 2007.
- LEROITH, D. e GAVRILOVA, O. Mouse models created to study the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Int J Biochem Cell Biol**, v.38, n.5-6, p.904-12. 2006.
- LEVINE, J. A., EBERHARDT, N. L. e JENSEN, M. D. Leptin responses to overfeeding: relationship with body fat and nonexercise activity thermogenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.8, Aug, p.2751-4. 1999.
- LICINIO, J., CAGLAYAN, S., OZATA, M., YILDIZ, B. O., DE MIRANDA, P. B., O'KIRWAN, F., WHITBY, R., LIANG, L., COHEN, P., BHASIN, S., KRAUSS, R. M., VELDHUIS, J. D., WAGNER, A. J., DEPAOLI, A. M., MCCANN, S. M. e WONG, M. L. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.13, Mar 30, p.4531-6. 2004.
- LINDSEY, C. J., FUJITA, K. e MARTINS, T. O. The central pressor effect of bradykinin in normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, v.11, n.2 Pt 2, Feb, p.1126-9. 1988.
- LINDSTROM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **ScientificWorldJournal**, v.7, p.666-85. 2007.

- LOMBARDO, Y. B. e MENAHAN, L. A. Gluconeogenesis in perfused livers of genetically obese-hyperglycemic (ob/ob) mice. **Horm Metab Res**, v.11, n.1, Jan, p.9-14. 1979.
- LOPEZ, M., SEOANE, L., GARCIA, M. C., LAGO, F., CASANUEVA, F. F., SENARIS, R. e DIEGUEZ, C. Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. **Biochem Biophys Res Commun**, v.269, n.1, Mar 5, p.41-5. 2000.
- LU, D., WILLARD, D., PATEL, I. R., KADWELL, S., OVERTON, L., KOST, T., LUTHER, M., CHEN, W., WOYCHIK, R. P., WILKISON, W. O. e ET AL. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. **Nature**, v.371, n.6500, Oct 27, p.799-802. 1994.
- MADEDDU, P., VARONI, M. V., PALOMBA, D., EMANUELI, C., DEMONTIS, M. P., GLORIOSO, N., DESSI-FULGHERI, P., SARZANI, R. e ANANIA, V. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. **Circulation**, v.96, n.10, Nov 18, p.3570-8. 1997.
- MAEDA, K., OKUBO, K., SHIMOMURA, I., MIZUNO, K., MATSUZAWA, Y. e MATSUBARA, K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. **Gene**, v.190, n.2, May 6, p.227-35. 1997.
- MALNICK, S. D. e KNOBLER, H. The medical complications of obesity. **Qjm**, v.99, n.9, Sep, p.565-79. 2006.
- MANSON, J. E., SKERRETT, P. J., GREENLAND, P. e VANITALLIE, T. B. The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians. **Arch Intern Med**, v.164, n.3, Feb 9, p.249-58. 2004.

- MANTZOROS, C. S. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. **Ann Intern Med**, v.130, n.8, Apr 20, p.671-80. 1999.
- MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacology**, v.30, n.1, Jun, p.1-26. 1995.
- MARCEAU, F., HESS, J. F. e BACHVAROV, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**, v.50, n.3, Sep, p.357-86. 1998.
- MASUZAKI, H., OGAWA, Y., ISSE, N., SATOH, N., OKAZAKI, T., SHIGEMOTO, M., MORI, K., TAMURA, N., HOSODA, K., YOSHIMASA, Y. e ET AL. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. **Diabetes**, v.44, n.7, Jul, p.855-8. 1995.
- MASUZAKI, H., OGAWA, Y., SAGAWA, N., HOSODA, K., MATSUMOTO, T., MISE, H., NISHIMURA, H., YOSHIMASA, Y., TANAKA, I., MORI, T. e NAKAO, K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nat Med**, v.3, n.9, Sep, p.1029-33. 1997.
- MATHIS, S. A., CRISCIMAGNA, N. L. e LEEB-LUNDBERG, L. M. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v.50, n.1, Jul, p.128-39. 1996.
- MAYER, J., RUSSELL, R. E., BATES, M. W. e DICKIE, M. M. Metabolic, nutritional and endocrine studies of the hereditary obesity-diabetes syndrome of mice and mechanism of its development. **Metabolism**, v.2, n.1, Jan, p.9-21. 1953.

- MCCARTHY, M. I. Progress in defining the molecular basis of type 2 diabetes mellitus through susceptibility-gene identification. **Hum Mol Genet**, v.13 Spec No 1, Apr 1, p.R33-41. 2004.
- MEIER, U. e GRESSNER, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. **Clin Chem**, v.50, n.9, Sep, p.1511-25. 2004.
- MEISTER, B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. **Vitam Horm**, v.59, p.265-304. 2000.
- MILIA, A. F., GROSS, V., PLEHM, R., DE SILVA, J. A., JR., BADER, M. e LUFT, F. C. Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B(2) receptor. **Hypertension**, v.37, n.6, Jun, p.1473-9. 2001.
- MILLAR, S. E., MILLER, M. W., STEVENS, M. E. e BARSH, G. S. Expression and transgenic studies of the mouse agouti gene provide insight into the mechanisms by which mammalian coat color patterns are generated. **Development**, v.121, n.10, Oct, p.3223-32. 1995.
- MOKDAD, A. H., BOWMAN, B. A., FORD, E. S., VINICOR, F., MARKS, J. S. e KOPLAN, J. P. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. **Jama**, v.286, n.10, Sep 12, p.1195-200. 2001.
- MOKDAD, A. H., MARKS, J. S., STROUP, D. F. e GERBERDING, J. L. Actual causes of death in the United States, 2000. **Jama**, v.291, n.10, Mar 10, p.1238-45. 2004.
- MOKDAD, A. H., SERDULA, M. K., DIETZ, W. H., BOWMAN, B. A., MARKS, J. S. e KOPLAN, J. P. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. **Jama**, v.282, n.16, Oct 27, p.1519-22. 1999.

- MONCADA, S., PALMER, R. M. e HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.43, n.2, Jun, p.109-42. 1991.
- MONTAGUE, C. T. e O'RAHILLY, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. **Diabetes**, v.49, n.6, Jun, p.883-8. 2000.
- MORAN, A., JACOBS, D. R., JR., STEINBERGER, J., HONG, C. P., PRINEAS, R., LUEPKER, R. e SINAIKO, A. R. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. **Diabetes**, v.48, n.10, Oct, p.2039-44. 1999.
- MORI, M. A., ARAUJO, R. C., REIS, F. C., SGAI, D. G., FONSECA, R. G., BARROS, C. C., MERINO, V. F., PASSADORE, M., BARBOSA, A. M., FERRARI, B., CARAYON, P., CASTRO, C. H., SHIMUTA, S. I., LUZ, J., BASCANDS, J. L., SCHANSTRA, J. P., EVEN, P. C., OLIVEIRA, S. M., BADER, M. e PESQUERO, J. B. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. **Diabetes**, Mar 10. 2008.
- MORLEY, J. E. e FLOOD, J. F. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. **Life Sci**, v.49, n.10, p.707-11. 1991.
- MOTOSHIMA, H., WU, X., SINHA, M. K., HARDY, V. E., ROSATO, E. L., BARBOT, D. J., ROSATO, F. E. e GOLDSTEIN, B. J. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, n.12, Dec, p.5662-7. 2002.
- MUKAI, H., FITZGIBBON, W. R., BOZEMAN, G., MARGOLIUS, H. S. e PLOTH, D. W. Bradykinin B2 receptor antagonist increases chloride and water

absorption in rat medullary collecting duct. **Am J Physiol**, v.271, n.2 Pt 2, Aug, p.R352-60. 1996.

MUZZIN, P., EISENSMITH, R. C., COPELAND, K. C. e WOO, S. L. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.25, Dec 10, p.14804-8. 1996.

MYNATT, R. L., MILTENBERGER, R. J., KLEBIG, M. L., ZEMEL, M. B., WILKINSON, J. E., WILKINSON, W. O. e WOYCHIK, R. P. Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.3, Feb 4, p.919-22. 1997.

NAGGERT, J. K., FRICKER, L. D., VARLAMOV, O., NISHINA, P. M., ROUILLE, Y., STEINER, D. F., CARROLL, R. J., PAIGEN, B. J. e LEITER, E. H. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. **Nat Genet**, v.10, n.2, Jun, p.135-42. 1995.

NISHIMURA, S., MANABE, I., NAGASAKI, M., HOSOYA, Y., YAMASHITA, H., FUJITA, H., OHSUGI, M., TOBE, K., KADOWAKI, T., NAGAI, R. e SUGIURA, S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**, v.56, n.6, Jun, p.1517-26. 2007.

NSA ALLOGHO, S., GOBEIL, F., PERRON, S. I., HESS, J. F. e REGOLI, D. Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B2 receptor mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.357, n.3, Mar, p.191-6. 1998.

- OSTLUND, R. E., JR., YANG, J. W., KLEIN, S. e GINGERICH, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.11, Nov, p.3909-13. 1996.
- PELLEYMOUNTER, M. A., CULLEN, M. J., BAKER, M. B., HECHT, R., WINTERS, D., BOONE, T. e COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v.269, n.5223, Jul 28, p.540-3. 1995.
- PERLEY, M. e KIPNIS, D. M. Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. **Diabetes**, v.15, n.12, Dec, p.867-74. 1966.
- PERRY, W. L., COPELAND, N. G. e JENKINS, N. A. The molecular basis for dominant yellow agouti coat color mutations. **Bioessays**, v.16, n.10, Oct, p.705-7. 1994.
- PESQUERO, J. B., ARAUJO, R. C., HEPPENSTALL, P. A., STUCKY, C. L., SILVA, J. A., JR., WALTHER, T., OLIVEIRA, S. M., PESQUERO, J. L., PAIVA, A. C., CALIXTO, J. B., LEWIN, G. R. e BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.14, Jul 5, p.8140-5. 2000.
- PETERSEN, K. F. e SHULMAN, G. I. Etiology of insulin resistance. **Am J Med**, v.119, n.5 Suppl 1, May, p.S10-6. 2006.
- PLUM, L., BELGARDT, B. F. e BRUNING, J. C. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. **J Clin Invest**, v.116, n.7, Jul, p.1761-6. 2006.

- POLONSKY, K. S., GIVEN, B. D. e VAN CAUTER, E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. **J Clin Invest**, v.81, n.2, Feb, p.442-8. 1988.
- PRODI, E. e OBICI, S. Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. **Endocrinology**, v.147, n.6, Jun, p.2664-9. 2006.
- RAHMOUNI, K. e HAYNES, W. G. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. **Curr Diab Rep**, v.5, n.4, Aug, p.260-6. 2005.
- RATTARASARN, C. Physiological and pathophysiological regulation of regional adipose tissue in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. **Acta Physiol (Oxf)**, v.186, n.2, Feb, p.87-101. 2006.
- REAVEN, G. M. e CHEN, Y. D. Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes. **Diabetes Metab Rev**, v.4, n.7, Nov, p.639-52. 1988.
- REAVEN, G. M., HOLLENBECK, C., JENG, C. Y., WU, M. S. e CHEN, Y. D. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. **Diabetes**, v.37, n.8, Aug, p.1020-4. 1988.
- REGOLI, D., RHALEB, N. E., DRAPEAU, G. e DION, S. Kinin receptor subtypes. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.15 Suppl 6, p.S30-8. 1990.
- REN, S., LI, M., CAI, H., HUDGINS, S. e FURTH, P. A. A simplified method to prepare PCR template DNA for screening of transgenic and knockout mice. **Contemp Top Lab Anim Sci**, v.40, n.2, Mar, p.27-30. 2001.
- REYNISDOTTIR, S., DAUZATS, M., THORNE, A. e LANGIN, D. Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.12, Dec, p.4162-6. 1997.

- RODEN, M., PRICE, T. B., PERSEGHIN, G., PETERSEN, K. F., ROTHMAN, D. L., CLINE, G. W. e SHULMAN, G. I. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. **J Clin Invest**, v.97, n.12, Jun 15, p.2859-65. 1996.
- ROWLAND, N. E., VAUGHAN, C. H., MATHES, C. M. e MITRA, A. Feeding behavior, obesity, and neuroeconomics. **Physiol Behav**, v.93, n.1-2, Jan 28, p.97-109. 2008.
- RYFFEL, B. Gene knockout mice as investigative tools in pathophysiology. **Int J Exp Pathol**, v.77, n.4, Aug, p.125-41. 1996.
- SAAD, M. F., DAMANI, S., GINGERICH, R. L., RIAD-GABRIEL, M. G., KHAN, A., BOYADJIAN, R., JINAGOUDA, S. D., EL-TAWIL, K., RUDE, R. K. e KAMDAR, V. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.2, Feb, p.579-84. 1997.
- SAHU, A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. **Endocrinology**, v.139, n.2, Feb, p.795-8. 1998.
- SAMAD, F. e LOSKUTOFF, D. J. Hemostatic gene expression and vascular disease in obesity: insights from studies of genetically obese mice. **Thromb Haemost**, v.82, n.2, Aug, p.742-7. 1999.
- SANTAGATA, S., BOGGON, T. J., BAIRD, C. L., GOMEZ, C. A., ZHAO, J., SHAN, W. S., MYSZKA, D. G. e SHAPIRO, L. G-protein signaling through tubby proteins. **Science**, v.292, n.5524, Jun 15, p.2041-50. 2001.

- SANTOMAURO, A. T., BODEN, G., SILVA, M. E., ROCHA, D. M., SANTOS, R. F., URSICH, M. J., STRASSMANN, P. G. e WAJCHENBERG, B. L. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. **Diabetes**, v.48, n.9, Sep, p.1836-41. 1999.
- SATOH, N., OGAWA, Y., KATSUURA, G., TSUJI, T., MASUZAKI, H., HIRAOKA, J., OKAZAKI, T., TAMAKI, M., HAYASE, M., YOSHIMASA, Y., NISHI, S., HOSODA, K. e NAKAO, K. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. **Endocrinology**, v.138, n.3, Mar, p.947-54. 1997.
- SCHAFER, K., FUJISAWA, K., KONSTANTINIDES, S. e LOSKUTOFF, D. J. Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice. **Faseb J**, v.15, n.10, Aug, p.1840-2. 2001.
- SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v.55, n.6, Jun, p.1537-45. 2006.
- SCHOLKENS, B. A. Kinins in the cardiovascular system. **Immunopharmacology**, v.33, n.1-3, Jun, p.209-16. 1996.
- SCHWARTZ, M. W., PESKIND, E., RASKIND, M., BOYKO, E. J. e PORTE, D., JR. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. **Nat Med**, v.2, n.5, May, p.589-93. 1996.
- SCHWARTZ, M. W., SEELEY, R. J., CAMPFIELD, L. A., BURN, P. e BASKIN, D. G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **J Clin Invest**, v.98, n.5, Sep 1, p.1101-6. 1996.

- SCROCCHI, L. A., HILL, M. E., SALEH, J., PERKINS, B. e DRUCKER, D. J. Elimination of glucagon-like peptide 1R signaling does not modify weight gain and islet adaptation in mice with combined disruption of leptin and GLP-1 action. **Diabetes**, v.49, n.9, Sep, p.1552-60. 2000.
- SENNELLO, J. A., FAYAD, R., PINI, M., GOVE, M. E. e FANTUZZI, G. Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin-deficient ob/ob mice. **Cytokine**, v.36, n.5-6, Dec, p.261-6. 2006.
- SHIMIZU, H., OH, I. S., OKADA, S. e MORI, M. Leptin resistance and obesity. **Endocr J**, v.54, n.1, Feb, p.17-26. 2007.
- SHOELSON, S. E., LEE, J. e GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v.116, n.7, Jul, p.1793-801. 2006.
- SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v.106, n.2, Jul, p.171-6. 2000.
- SIEGMUND, B., SENNELLO, J. A., LEHR, H. A., BATRA, A., FEDKE, I., ZEITZ, M. e FANTUZZI, G. Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice. **J Leukoc Biol**, v.76, n.4, Oct, p.782-6. 2004.
- SORENSEN, H., BRAND, C. L., NESCHEN, S., HOLST, J. J., FOSGERAU, K., NISHIMURA, E. e SHULMAN, G. I. Immunoneutralization of endogenous glucagon reduces hepatic glucose output and improves long-term glycemic control in diabetic ob/ob mice. **Diabetes**, v.55, n.10, Oct, p.2843-8. 2006.
- SPALDING, K. L., ARNER, E., WESTERMARK, P. O., BERNARD, S., BUCHHOLZ, B. A., BERGMANN, O., BLOMQVIST, L., HOFFSTEDT, J.,

- NASLUND, E., BRITTON, T., CONCHA, H., HASSAN, M., RYDEN, M., FRISEN, J. e ARNER, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v.453, n.7196, Jun 5, p.783-7. 2008.
- STEPHENS, J. M. e PEKALA, P. H. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. **J Biol Chem**, v.266, n.32, Nov 15, p.21839-45. 1991.
- TARTAGLIA, L. A., DEMBSKI, M., WENG, X., DENG, N., CULPEPPER, J., DEVOS, R., RICHARDS, G. J., CAMPFIELD, L. A., CLARK, F. T., DEEDS, J., MUIR, C., SANKER, S., MORIARTY, A., MOORE, K. J., SMUTKO, J. S., MAYS, G. G., WOOL, E. A., MONROE, C. A. e TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v.83, n.7, Dec 29, p.1263-71. 1995.
- THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen Pharmacol**, v.29, n.2, Aug, p.159-66. 1997.
- THRYBOM, T., ROOTH, P. e LINDSTROM, P. Effect of serotonin reuptake inhibitor on syndrome development in obese hyperglycemic mice (Umea ob/ob). **Metabolism**, v.50, n.2, Feb, p.144-50. 2001.
- TILG, H. e MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.10, Oct, p.772-83. 2006.
- TOSCHKE, A. M., VON KRIES, R., BEYERLEIN, A. e RUCKINGER, S. Risk factors for childhood obesity: shift of the entire BMI distribution vs. shift of the upper tail only in a cross sectional study. **BMC Public Health**, v.8, p.115. 2008.

- TRAYHURN, P. e JAMES, W. P. Thermoregulation and non-shivering thermogenesis in the genetically obese (ob/ob) mouse. **Pflugers Arch**, v.373, n.2, Feb 22, p.189-93. 1978.
- TRAYHURN, P. e WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans**, v.33, n.Pt 5, Nov, p.1078-81. 2005.
- TRITOS, N. A., VICENT, D., GILLETTE, J., LUDWIG, D. S., FLIER, E. S. e MARATOS-FLIER, E. Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. **Diabetes**, v.47, n.11, Nov, p.1687-92. 1998.
- VAISSE, C., HALAAS, J. L., HORVATH, C. M., DARNELL, J. E., JR., STOFFEL, M. e FRIEDMAN, J. M. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat Genet**, v.14, n.1, Sep, p.95-7. 1996.
- WEIGLE, D. S., DUELL, P. B., CONNOR, W. E., STEINER, R. A., SOULES, M. R. e KUIJPER, J. L. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.2, Feb, p.561-5. 1997.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. e FERRANTE, A. W., JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v.112, n.12, Dec, p.1796-808. 2003.
- WELLEN, K. E. e HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v.115, n.5, May, p.1111-9. 2005.

- WELLEN, K. E., UYSAL, K. T., WIESBROCK, S., YANG, Q., CHEN, H. e HOTAMISLIGIL, G. S. Interaction of tumor necrosis factor-alpha- and thiazolidinedione-regulated pathways in obesity. **Endocrinology**, v.145, n.5, May, p.2214-20. 2004.
- WELLHOENER, P., FRUEHWALD-SCHULTES, B., KERN, W., DANTZ, D., KERNER, W., BORN, J., FEHM, H. L. e PETERS, A. Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.3, Mar, p.1267-71. 2000.
- WESTMAN, S. Development of the obese-hyperglycaemic syndrome in mice. **Diabetologia**, v.4, n.3, Jun, p.141-9. 1968.
- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. e CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v.112, n.12, Dec, p.1821-30. 2003.
- YANAI, H., TOMONO, Y., ITO, K., FURUTANI, N., YOSHIDA, H. e TADA, N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. **Nutr J**, v.7, p.10. 2008.
- YANG, Q., GRAHAM, T. E., MODY, N., PREITNER, F., PERONI, O. D., ZABOLOTNY, J. M., KOTANI, K., QUADRO, L. e KAHN, B. B. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature**, v.436, n.7049, Jul 21, p.356-62. 2005.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. e FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, n.6505, Dec 1, p.425-32. 1994.

- ZHOU, D. e SHEARMAN, L. P. Voluntary exercise augments acute effects of CB1-receptor inverse agonist on body weight loss in obese and lean mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v.77, n.1, Jan, p.117-25. 2004.
- ZICK, Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.27 Suppl 3, Dec, p.S56-60. 2003.

Anexo 1

Comparação das massas entre machos e fêmeas *ob/ob*. Valores das médias das massas dos órgãos estão expressos em $\mu\text{g/g}$ PV (massa relativa).

		Fêmeas			Machos			T-	
		Média	E.P.M.	n	Média	E.P.M.	n	student	Valor de p
<i>ob/ob</i>	Massa	63,14	\pm 1,48	11	61,62	\pm 1,50	11		0,4803015
	Fígado	42,20	\pm 2,32	11	58,72	\pm 2,32	11	***	6,434E-05
	Baço	1,74	\pm 0,33	11	1,49	\pm 0,17	11		0,5178417
	Pâncreas	6,08	\pm 0,44	11	5,70	\pm 0,42	10		0,5453574
	Rim	6,59	\pm 0,27	11	7,72	\pm 0,25	10	**	0,0061457
	M.E	3,76	\pm 0,18	11	4,29	\pm 0,19	11		0,0597393
	Coração	2,79	\pm 0,10	11	3,00	\pm 0,10	11		0,1610627
	V.E	1,80	\pm 0,07	11	2,03	\pm 0,09	10		0,0644697
	V.D	0,52	\pm 0,03	11	0,47	\pm 0,02	10		0,2077176
	Átrio	0,21	\pm 0,02	11	0,18	\pm 0,02	10		0,305135
	T.A.I	73,88	\pm 8,90	11	35,03	\pm 1,60	11	***	0,0003515
	T.A.P	41,39	\pm 7,94	11	28,86	\pm 1,61	10		0,1560001
	TAA	115,27	\pm 5,65	11	63,91	\pm 2,19	10	***	1,24E-07
	TASC	192,95	\pm 9,46	6	170,24	\pm 12,53	3		0,2010109

Comparação das massas entre machos e fêmeas *ob/obB2-/-*. Valores das médias das massas dos órgãos estão expressos em $\mu\text{g/g}$ PV (massa relativa).

		Fêmeas			Machos			T-	
		Média	E.P.M.	n	Média	E.P.M.	n	student	Valor de p
<i>ob/obB2-/-</i>	Massa	67,78	\pm 1,60	13	65,84	\pm 2,04	8		0,463873
	Fígado	38,83	\pm 2,70	13	53,64	\pm 3,43	7	**	0,0038015
	Baço	2,30	\pm 0,33	13	2,00	\pm 0,37	8		0,5658491
	Pâncreas	5,97	\pm 0,49	13	6,52	\pm 0,73	7		0,5260104
	Rim	6,00	\pm 0,18	12	7,19	\pm 0,32	8	**	0,0025192
	M.E	3,57	\pm 0,15	13	3,87	\pm 0,23	8		0,2713985
	Coração	2,72	\pm 0,07	13	2,98	\pm 0,14	8		0,0799769
	V.E	1,87	\pm 0,03	13	2,02	\pm 0,09	7	*	0,0467649
	V.D	0,42	\pm 0,05	13	0,51	\pm 0,07	7		0,3099162
	Átrio	0,17	\pm 0,01	13	0,24	\pm 0,04	7	*	0,0470509
	T.A.I	68,45	\pm 3,34	13	36,58	\pm 3,33	8	***	4,27E-06
	T.A.P	35,91	\pm 3,87	13	29,22	\pm 3,08	8		0,2402821
	TAA	104,36	\pm 3,64	13	65,81	\pm 5,33	8	***	6,059E-06
	TASC	203,62	\pm 5,99	6	161,52	\pm 23,44	4		0,0682362

Comparação das massas entre machos e fêmeas *ob/obB1B2-/-*. Médias das massas dos órgãos expressas em $\mu\text{g/g}$ PV (massa relativa).

	Fêmeas			Machos			T-	
	Média	E.P.M.	n	Média	E.P.M.	n	student	Valor de P
<i>ob/obB1B2-/-</i>	Massa	63,17 \pm 1,17	15	63,49 \pm 1,19	14			0,8534339
	Fígado	53,73 \pm 3,43	15	60,24 \pm 2,30	14			0,1320439
	Baço	2,26 \pm 0,22	15	2,31 \pm 0,18	14			0,8719257
	Pâncreas	4,94 \pm 0,29	15	5,74 \pm 0,37	14			0,1002265
	Rim	6,16 \pm 0,14	15	6,69 \pm 0,49	14			0,2906262
	M.E	3,73 \pm 0,16	13	3,55 \pm 0,32	14			0,6234165
	Coração	2,56 \pm 0,06	15	2,99 \pm 0,09	14	***		0,0004917
	V.E	1,68 \pm 0,04	14	2,00 \pm 0,08	14	**		0,0010348
	V.D	0,50 \pm 0,04	15	0,45 \pm 0,02	14			0,24123
	Átrio	0,17 \pm 0,02	13	0,18 \pm 0,02	14			0,7358792
	T.A.I	60,49 \pm 5,28	15	32,49 \pm 2,73	14	***		8,598E-05
	T.A.P	28,95 \pm 2,73	15	22,89 \pm 1,85	14			0,0808415
	TAA	90,24 \pm 5,75	14	55,37 \pm 3,02	14	***		1,285E-05
	TASC	212,35 \pm 9,01	10	176,20 \pm 4,93	5	*		0,0183719

Comparação das massas entre machos e fêmeas *ob/ob*. Valores das médias das massas dos órgãos estão expressos em gramas (massa absoluta).

	Fêmeas			Machos			T-	
	Média	E.P.M.	n	Média	E.P.M.	n	student	Valor de p
<i>ob/ob</i>	Massa	63,14 \pm 1,48	11	61,62 \pm 1,50	11			0,4803015
	Fígado	2,65 \pm 0,14	11	3,60 \pm 0,13	11	***		6,258E-05
	Baço	0,11 \pm 0,02	11	0,09 \pm 0,01	11			0,4492707
	Pâncreas	0,38 \pm 0,02	11	0,35 \pm 0,02	10			0,4133572
	Rim	0,42 \pm 0,02	11	0,47 \pm 0,02	10			0,0546051
	M.E	0,24 \pm 0,01	11	0,26 \pm 0,01	11	*		0,039742
	Coração	0,18 \pm 0,01	11	0,18 \pm 0,01	11			0,5038295
	V.E	0,11 \pm 0,01	11	0,12 \pm 0,01	10			0,22866
	V.D	0,03 \pm 0,00	11	0,03 \pm 0,00	10			0,0973796
	Átrio	0,01 \pm 0,00	11	0,01 \pm 0,00	10			0,1611821
	T.A.I	4,66 \pm 0,56	11	2,15 \pm 0,10	11	***		0,0002468
	T.A.P	2,60 \pm 0,48	11	1,79 \pm 0,13	10			0,1358678
	TAA	7,26 \pm 0,35	11	3,94 \pm 0,17	10	***		1,162E-07
	TASC	12,47 \pm 0,86	6	10,88 \pm 1,48	3			0,3490616

Comparação das massas entre machos e fêmeas *ob/obB2-/-*. Valores das médias das massas dos órgãos expressos em g (massa absoluta).

		Fêmeas			Machos			T-	
		Média	E.P.M.	n	Média	E.P.M.	n	student	Valor de p
<i>ob/obB2-/-</i>	Massa	67,78	± 1,60	13	65,84	± 2,04	8		0,463873
	Fígado	2,63	± 0,20	13	3,55	± 0,23	7	*	0,0108488
	Baço	0,15	± 0,02	13	0,13	± 0,02	8		0,4879403
	Pâncreas	0,40	± 0,03	13	0,42	± 0,04	7		0,7683543
	Rim	0,40	± 0,01	12	0,47	± 0,02	8	*	0,0106974
	M.E	0,24	± 0,01	13	0,25	± 0,01	8		0,4127732
	Coração	0,18	± 0,01	13	0,20	± 0,01	8		0,2612025
	V.E	0,13	± 0,00	13	0,13	± 0,01	7		0,2373208
	V.D	0,03	± 0,00	13	0,03	± 0,00	7		0,2648099
	Átrio	0,01	± 0,00	13	0,02	± 0,00	7	*	0,0453268
	T.A.I	4,62	± 0,22	13	2,41	± 0,24	8	***	2,755E-06
	T.A.P	2,44	± 0,27	13	1,91	± 0,19	8		0,1777049
	TAA	7,06	± 0,27	13	4,32	± 0,37	8	***	6,905E-06
	TASC	13,86	± 0,42	6	10,23	± 1,17	4	**	0,0091965

Comparação das massas entre machos e fêmeas *ob/obB1B2-/-*. Valores das médias das massas dos órgãos expressos em g (massa absoluta).

		Fêmeas			Machos			T-	
		Média	E.P.M.	n	Média	E.P.M.	n	student	Valor de p
<i>ob/obB1B2-/-</i>	Massa	63,17	± 1,17	15	63,49	± 1,19	14		0,8534339
	Fígado	3,62	± 0,22	15	3,79	± 0,15	14		0,1753689
	Baço	0,14	± 0,01	15	0,14	± 0,01	14		0,7275685
	Pâncreas	0,31	± 0,01	15	0,37	± 0,02	14		0,0827021
	Rim	0,40	± 0,01	15	0,42	± 0,03	14		0,3037569
	M.E	0,25	± 0,01	13	0,24	± 0,02	14		0,5293525
	Coração	0,16	± 0,00	15	0,19	± 0,01	14	**	0,0010163
	V.E	0,11	± 0,00	14	0,13	± 0,00	14	**	0,0012986
	V.D	0,03	± 0,00	15	0,03	± 0,00	14		0,3057508
	Átrio	0,01	± 0,00	13	0,01	± 0,00	14		0,8088201
	T.A.I	3,63	± 0,28	15	2,15	± 0,19	14	***	9,492E-05
	T.A.P	1,77	± 0,14	15	1,47	± 0,12	14		0,0862406
	TAA	5,41	± 0,31	15	3,62	± 0,19	14	***	1,243E-05
	TASC	14,15	± 0,59	10	10,92	± 0,47	5	*	0,0136928

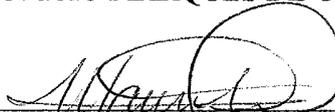
Anexo 2

Mogi das Cruzes, 14 de março de 2008

Ao Acadêmico
Carlos Castilho de Barros

O Comitê de Ética em Manipulação e Experimentação Animal da Universidade de Mogi das Cruzes, considerou o projeto intitulado “MÉTODO SIMPLES PARA OBTER E MANTER COLÔNIAS DE MODELOS BIOLÓGICOS DERIVADOS DO CAMUNDONGO ob/ob”, protocolo 02/08, de autoria do Doutorando CARLOS CASTILHO DE BARROS, sob orientação do Prof. Dr. RONALDO DE CARVALHO ARAÚJO, **APROVADO**. O delineamento experimental está conforme aos preceitos bioéticos da utilização de modelos animais.

MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA



Presidente do CEMEA/UMC

COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEMEA/UMC

Ao Prof.

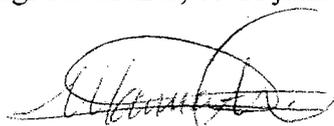
CARLOS CASTILHO DE BARROS
RONALDO DE CARVALHO ARAUJO

PARECER

O trabalho intitulado: "CARACTERIZAÇÃO DO CAMUNDONGO DUPLO NOCAUTE PARA RECEPTORES B1 E B2 DE CININAS" (protocolo 015/05), de autoria do Prof. CARLOS CASTILHO DE BARROS, sob orientação do Prof. Dr. RONALDO DE CARVALHO ARAÚJO, foi considerado **APROVADO** por esta comissão. Consideramos a seleção, alojamento, manipulação e número de sujeitos experimentais adequados aos princípios bioéticos na utilização de animais em experimentação.

Sem mais no momento, despedimo-nos.

Mogi das Cruzes, 05 de junho de 2006.



MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA
CEMEA/UMC

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](#)