

Sérgio Henrique Sousa Santos

**Avaliação dos distúrbios metabólicos
produzidos pela deleção genética do
receptor de angiotensina-(1-7), Mas, em
Camundongos FVB/N**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Avaliação dos distúrbios metabólicos
produzidos pela deleção genética do
receptor de angiotensina-(1-7), Mas, em
Camundongos FVB/N

Dissertação de mestrado apresentado ao
programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal de Minas Gerais

Aluno: Sérgio Henrique Sousa Santos

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto
Souza dos Santos

Co-Orientadora: Prof. Dra. Jaqueline Isaura
Alvarez Leite

Belo Horizonte, 2007

Agradecimentos

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

Aos meus pais, que apesar de todas as dificuldades, priorizaram os estudos dos filhos e assim possibilitaram essa vitória. Vocês sabem o quanto amo vocês. Dedico cada conquista profissional ao esforço e zelo que tiveram todos esses anos.

Obrigado as minhas irmãs, avó, tios, primos e amigos que torceram por mim e rezaram para que meus sonhos se realizassem.

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

Obrigado aos meus colegas de laboratório e de faculdade pela força, auxílio e incentivo oferecidos por todos esses anos na UFMG.

A todos vocês o meu muito obrigado.

"nem tudo o que é importante é prioritário, e nem tudo o que é
necessário é indispensável!"

"Antes tentar e errar que formar fila com os pobres de espírito que não conhecem
nem a vitória e nem a derrota!"

Resumo

A síndrome metabólica, também conhecida como síndrome de resistência à insulina, é caracterizada pela coexistência variável de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão. A angiotensina-(1-7) apresenta um importante papel contraregulatório dentro do Sistema Renina Angiotensina, se opondo, na maioria das vezes, aos efeitos da angiotensina II. Tem sido demonstrado que o receptor acoplado a proteína G, Mas, medeia várias ações da angiotensina-(1-7). Observamos recentemente que camundongos machos *knockout* para o receptor Mas (*Mas*^{-/-}) com background genético FVB/N, apresenta pressão sanguínea elevada e disfunção endotelial, alterações presentes no quadro de síndrome metabólica.

O objetivo desse estudo foi verificar se a deleção genética do receptor Mas altera o perfil lipídico e glicêmico desses animais e os mecanismos envolvidos nesse processo. Camundongos WT e *knockout* machos com aproximadamente dez semanas de vida foram utilizados. Curvas de glicemia pelo tempo foram construídas após aplicação intraperitoneal de insulina (0.75U/Kg) ou glicose (2g/Kg). Após o sacrifício os tecidos foram pesados e reservados para western blotting e Real-Time PCR. O perfil lipídico e os níveis plasmáticos de leptina e adiponectina foram avaliados utilizando kits de ELISA e a expressão do mRNA do TGF- β , angiotensinogênio e do TNF- α foram analisados pela técnica de Real-Time PCR.

Apesar de apresentar peso corporal igual ao do controle (24.7 ± 0.35 vs 24.8 ± 0.24 g no WT), os camundongos *Mas*^{-/-} jovens apresentaram marcante aumento no peso do tecido adiposo (epididimal= 1.704 ± 0.1516 vs 1.150 ± 0.1259 % do PC no WT e retroperitoneal= 0.6747 ± 0.08576 vs 0.3781 ± 0.04575 % do PC no WT). Além disso, esses animais apresentam resistência a

insulina e maior intolerância a glicose, bem como um aumento na glicemia de jejum (86.6 ± 6.43 vs 56.40 ± 4.98 mg/dl no WT). Também foram encontrados aumentos significativos nos níveis plasmáticos de colesterol total (92.2 ± 3.65 vs 74.6 ± 5.67 mg/dl no WT) e triglicérides (70.6 ± 13.3 vs 41.4 ± 4.07 mg/dl no WT). Parte dessas alterações podem ser explicadas pelo aumento nos níveis séricos de leptina (1.3 ± 0.25 vs 0.73 ± 0.17 ng/ml no WT) e pela diminuição na expressão protéica do receptor Glut-4 no tecido adiposo epididimal dos *Mas*^{-/-}. A expressão do RNA mensageiro do TGF- β e do angiotensinogênio estão aumentados no tecido adiposo, enquanto a expressão do TNF- α , o consumo de comida e os níveis plasmáticos de adiponectina, não estão alterados. Juntos, esses dados indicam um importante papel do receptor Mas na função cardiovascular e metabólica em camundongos FVB/N e sugerem um quadro de síndrome metabólica nos camundongos knockout Mas.

Abstract

The metabolic syndrome, also known as insulin resistance syndrome, is characterized by the variable coexistence of obesity, insulin resistance, dislipidemia and hypertension. The angiotensin-(1-7) presents an important counterregulatory role inside Renin Angiotensin System, opposing some times to angiotensin II effects. It has been shown that G protein-coupled receptor, Mas, mediates many actions of angiotensin-(1-7). We have recently observed that *Mas-knockout* male mice (*Mas^{-/-}*) in the pure, FVB/N genetic background, presents elevated blood pressure levels and endothelial dysfunction, alterations present in the metabolic syndrome.

The aim of this study was to ascertain whether genetic deletion of Mas also changes lipidic and glycemic profile and the mechanisms of these alterations.

Ten weeks old *Mas^{-/-}* and WT mice were used. Curves of plasma glycemia versus time were built after intraperitoneal application of insulin (0.75U/Kg BW) or glucose (2g/Kg BW). After sacrifice, the tissues were weighted and reserved for western blotting and Real-Time PCR. The lipidic profile and the plasma levels of leptin and adiponectin were analyzed using ELISA kits and TGF- β , angiotensinogen and TNF- α mRNA expression was analyzed by Real Time PCR.

Despite of having normal body weight (24.7 ± 0.35 vs 24.8 ± 0.24 g in WT), young *Mas^{-/-}* mice presented a marked increase in the fat tissue mass (epididimal= 1.704 ± 0.1516 vs 1.150 ± 0.1259 % of BW in WT and retroperitoneal= 0.6747 ± 0.08576 vs 0.3781 ± 0.04575 % of BW in WT). In addition, these animals presented a state of insulin resistance and glucose intolerance as well as an increase in the fasting glycemia levels (86.6 ± 6.43 vs 56.40 ± 4.98 mg/dl in WT). Furthermore, a significant increase in total

cholesterol (92.2 ± 3.65 vs 74.6 ± 5.67 mg/dl in WT) and triglycerides (70.6 ± 13.3 vs 41.4 ± 4.07 mg/dl in WT) levels were observed. Part of these alterations can be explained by the increase in the leptin plasma levels (1.3 ± 0.25 vs 0.73 ± 0.17 ng/ml in WT) and the decreased Glut4 receptor protein in *Mas*^{-/-} adipose tissue. The mRNA expression of TGF- β and angiotensinogen was increased in *Mas*^{-/-} adipose tissue, while the expression of TNF- α , the food intake and adiponectin plasma levels, were not altered.

These results show that *Mas* deficiency in FVB/N mice leads to dramatic changes in glycaemic and lipidic metabolism, inducing a metabolic syndrome- like state.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1- Introdução | 1 |
| 2- Revisão Bibliográfica | 1 |
| 2.1 Sistema Renina Angiotensina..... | 1 |
| 2.2 Angiotensina II..... | 2 |
| 2.3 Angiotensina-(1-7)..... | 4 |
| 2.4 Camundongo Knock-out Mas..... | 8 |
| 2.5 TNF- α | 11 |
| 2.6 Leptina..... | 12 |
| 2.7 Resistina..... | 14 |
| 2.8 Adiponectina..... | 15 |
| 2.9 Interação do sistema renina-angiotensina com o metabolismo..... | 17 |
| 2.10 Mecanismos moleculares podem correlacionar o SRA à SM..... | 23 |
| 3- Objetivos | 24 |
| 3.1 Gerais..... | 24 |
| 3.2 Específicos | 24 |
| 4- Materiais e Métodos | 25 |
| 4.1 Animais..... | 25 |
| 4.2 Amostras de sangue..... | 25 |
| 4.3 Peso Corporal e peso adiposo..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Ingestão alimentar..... | 26 |
| 4.5 Determinação dos níveis plasmáticos de leptina e adiponectina..... | 26 |
| 4.6 Determinação dos níveis de colesterol total..... | 26 |
| 4.7 Determinação de colesterol HDL..... | 28 |
| 4.8 Determinação dos níveis de triglicerídeos..... | 27 |
| 4.9 Histologia de tecido adiposo..... | 28 |
| 4.10 Genotipagem..... | 28 |
| 4.10.1 Extração do DNA genômico..... | 28 |
| 4.10.2 PCR e detecção de amplificação em gel de agarose..... | 29 |
| 4.11 RT e Real Time PCR..... | 30 |
| 4.11.1 Extração de RNA total..... | 30 |
| 4.11.2 Eliminação de moléculas de DNA genômico da amostra de RNA total..... | 31 |
| 4.11.3 Quantificação do RNA total..... | 31 |
| 4.11.4 RT (Transcrição Reversa)..... | 31 |
| 4.11.5 PCR Quantitativa..... | 32 |
| 4.12 Extração de proteínas totais..... | 33 |
| 4.13 Western Blotting..... | 33 |
| 4.14 Testes de Tolerância à Glicose e Sensibilidade Insulínica..... | 34 |
| 4.15 Análises estatísticas e expressão dos resultados..... | 35 |
| 5- Resultados..... | 36 |
| 5.1 Peso corporal e peso adiposo..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 Ingestão de alimentos..... | 38 |
| 5.3 Histologia do tecido adiposo epididimal..... | 39 |
| 5.4 Perfil Lipídico..... | 40 |
| 5.5 Perfil Glicêmico..... | 41 |
| 5.6 Western Blotting do receptor Glut4 no tecido adiposo | 43 |
| 5.7 Dosagem dos níveis plasmáticos de adipocitocinas | 44 |
| 5.8 Expressão gênica de angiotensinogênio, TGF- β e TNF- α por Real Time PCR do tecido adiposo..... | 47 |
| 6- Discussão..... | 48 |
| 7- Conclusão..... | 55 |
| 8- Referencias Bibliográficas..... | 56 |

Lista de Figuras e Quadros

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema representativo do mecanismo hipotético de regulação da leptina..... | 13 |
| Figura 2 – Alterações patofisiológicas associadas com a ativação do SRA do tecido adiposo na obesidade..... | 22 |
| Figura 3 – Peso corporal em gramas dos grupos de animais..... | 36 |
| Figura 4 – Porcentagem da massa de tecido adiposo pelo peso corporal.. | 37 |
| Figura 5 – Massa de comida ingerida corrigida pelo peso corporal..... | 38 |
| Figura 6 – Análise histológica (HE) do tecido adiposo epididimal..... | 39 |
| Figura 7 – Perfil lipídico dos camundongos..... | 40 |
| Figura 8 – Perfil glicêmico dos camundongos..... | 42 |
| Figura 9 – Western Blotting de amostras de tecido adiposo epididimal..... | 43 |
| Figura 10 – Níveis plasmáticos de leptina..... | 45 |
| Figura 11 – Níveis plasmáticos de adiponectina..... | 46 |
| Figura 12 –PCR em tempo real do RNA do tecido adiposo epididimal..... | 47 |
| Quadro 1 – Primers e condições experimentais utilizadas para a PCR do Mas..... | 30 |
| Quadro 2 – Primers e condições experimentais utilizadas para o Real Time PCR | 32 |

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas Químicas

A-779 = Antagonista específico do receptor Mas

A-MSH = Hormônio estimulante de melanócitos

AdipoR1/2 = Receptores de adiponectina

AGT= Angiotensinogênio

Ang I = Angiotensina I

Ang II = Angiotensina II

Ang III = Angiotensina III

Ang IV = Angiotensina IV

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

ApN = Adiponectina

AT₁ = Receptor tipo 1 de angiotensina II

AT₂ = Receptor tipo 2 de angiotensina II

B₂ = Receptor tipo 2 de bradicinina

C57Bl/6 = Linhagem de camundongos pretos

CART = Transcrito regulado por cocaína e anfetamina

cDNA = DNA complementar

CHO = Células de ovário de hamster chinês

CSF = Fator estimulador de colônias

CRH = Hormônio liberador de corticotropina

CV11974 = Antagonista específico do receptor AT₁

CVLM = Medula ventro lateral caudal

DEPC = Dietil pirocarbonato

DNA = Ácido desoxiribonucléico (*Desoxiribonucleic Acid*)

ECA = Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 = Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA = Ácido etilenediaminotetracético

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

ET-1 = Endotelina 1

FVB/N = Linhagem de camundongos brancos

gApN = Fragmento da ApN

GLUT4 = Transportador de glicose do tipo 4

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica

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

HE = Hematoxilina e Eosina

HOE-140 = Antagonista específico do receptor B₂

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

iECA = Inibidor da ECA

IFN = Interferons

IL = Interleucinas

IMC = Índice de massa corpórea

KO = Deleção genética de um determinado gene (*Knockout*)

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

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

NEP = Endopeptidase Neutra

NF- κ β = Fator nuclear κ β

NO = Oxido Nítrico

NPY = Neuropeptídeo Y

ob = Gene da obesidade

PCP = Prolil-Carboxipeptidase

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

PD123319 = Antagonista específico do receptor AT₂

PEP = Prolil-Endopeptidase Neutra

PG = Prostaglandinas

PGI₂ = Prostaciclina

pH = Potencial hidrogeniônico

PKA = Proteína quinase A

PKB/AKT = Proteína quinase B

PKC = Proteína quinase C

POMC = Proopiomelanocortina

PPAR- α = Receptores nucleares alfa ativados por proliferadores de peroxissomas

PPAR- γ = Receptores nucleares gama ativados por proliferadores de peroxissomas

SD = Sprague Dawley

SM = Síndrome Metabólica

SNS = Sistema Nervoso Simpático

SRA = Sistema Renina Angiotensina

RI = Resistência a Insulina

RNA = Ácido ribonucléico (*RiboNucleic Acid*)

RNA_m = RNA mensageiro

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

RPM = Rotações por minuto

RT = Transcrição reversa (*reverse transcription*)

RVLM = Medula ventro lateral rostral

TBS-T = Tris-Base com Tween

TGF- β = Fator de transformação de crescimento

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

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

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

WT = Selvagem/Controle (*Wild Type*)

μg = Micrograma

μL = Microlitros

μm = Micrômetros

11- INTRODUÇÃO

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

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

São conhecidas várias interações da Ang II com a insulina, assim como com o metabolismo e função endócrina do tecido adiposo. Porém não existem estudos sobre o papel fisiológico da Ang-(1-7), agindo via seu receptor Mas, no controle fino do metabolismo glicêmico e lipídico.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina constitui uma cascata hormonal coordenada iniciada pela biossíntese da enzima renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é então liberada por essas células através de exocitose, agindo enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT) hidrolisando-o em um decapeptídeo inativo, a

angiotensina I (Ang I). Este peptídeo será catabolizado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo biologicamente ativo, a Ang II.

A renina não possui ação (não enzimática) biológica direta identificada; porém, seu precursor, a prorenina teve recentemente seu receptor identificado, exercendo assim ações biológicas diretas (Nguyen, G. et. al., 1996; Nguyen, G. et. al., 2002). A Ang II também pode ser formada por outras vias independentes da renina, pela ação de catepsinas e quimases.

2.2 Angiotensina II (Ang II)

A Ang II é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos e é considerada, ainda hoje o principal componente desse sistema.

Até há algum tempo, acreditava-se que a Ang II era metabolizada em fragmentos de peptídeos biologicamente inativos por peptidases da circulação e dos tecidos. No entanto, vários estudos mostraram que pelo menos três desses produtos metabólicos apresentam atividade biológica. A Ang II pode ser degradada à des-aspartil¹-Ang II (Ang III) que é eqüipotente à Ang II em sua interação com o receptor AT₁, mas tem baixa eficácia *in vivo* devido ao seu metabolismo acelerado na circulação. O segundo produto metabólico da Ang II é o hexapeptídeo Ang IV, que tem demonstrado, em estudos, causar vasodilatação e natriurese (Handa R. K. et. al., 2001).

A Ang II exerce seus efeitos via dois receptores distintos, AT₁ e AT₂ (Batenburg, W.W., et.al., 2004), sendo que os mais conhecidos efeitos fisiológicos e patológicos da Ang II são mediados via receptores AT₁, acoplados a múltiplas interações com cascatas de transdução de sinal, comandando diversas ações biológicas (Zhong Jian Cheng, et. al., 2005).

Dentre as principais ações via AT_1 a Ang II induz vasoconstrição vascular (preferencialmente renal, cerebral e coronariana); a retenção renal de sódio (via liberação de aldosterona); retenção renal de água (via liberação de vasopressina); supressão da renina (por feedback negativo); hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos; estimulação de fibrose no miocárdio e vascular; efeito inotrópico positivo (contração de cardiomiócitos); ativação do sistema nervoso simpático (SNS); estimulação da secreção endotelial e estimulação da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zhong Jian Cheng, et. al., 2005).

O receptor AT_2 vem mostrando, na maioria das vezes, exercer efeitos opostos às ações mediadas pelo receptor AT_1 . Sua expressão é muito alta no período fetal e decai com o envelhecimento. Os principais efeitos de sua ativação são o antiproliferativo, a inibição do crescimento celular; diferenciação celular; reparação tecidual; apoptose; vasodilatação; desenvolvimento dos rins e trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca (Batenburg, W.W., et.al., 2004).

Sabe-se que doenças como hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e aterosclerose resultam em disfunção vascular e mudanças estruturais, incluindo disfunção endotelial, alteração da contratilidade e remodelamento vascular; alterações que podem ser geradas por aumento da atividade da Ang II (Giacchetti G. et. al., 2005). Os eventos celulares relacionados com esse processo envolvem mudanças no músculo vascular liso com relação ao crescimento, apoptose, migração celular, inflamação e fibrose. Dentre os vários fatores que influenciam as mudanças celulares, a Ang II aparece como um dos mais importantes (Zhong Jian Cheng, et. al., 2005). Evidências crescentes indicam que a Ang II induz efeitos pleiotrópicos vasculares através da formação de NADPH, gerando ROS, que são importantes segundos mensageiros intracelulares e intercelulares,

modulando vários sinais moleculares, como as proteínas tirosina fosfatases, proteínas tirosina quinases, fatores de transcrição, ativação de canais iônicos, dentre outros. Sob condições patológicas as ROS contribuem para a disfunção vascular e remodelamento através de danos oxidativos (Singh B.M., Mehta J.L., 2003).

2.3 Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) é o terceiro e mais promissor metabólito da Ang II, visto que estudos recentes já apontam seu possível papel terapêutico (Santos R.A.S. et al., 2005). Sabe-se que a Ang-(1-7) libera óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI₂) causando vasodilatação, inibindo a proliferação celular muscular e a trombogênese, (Rajendran S, et.al., 2005; Kucharewicz I. et. al., 2002), atenuando o efeito vasoconstritor da Ang II (Lemos V.S. et. al., 2002; Clark M.A. et. al., 2001) e inibindo a ECA (Deddish P.A. et. al., 1998). Desequilíbrios na interação harmônica entre Ang II e Ang-(1-7) parecem contribuir para o início e desenvolvimento de doenças.

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

ação da ECA ou de outras peptidases (Donoghue *et al.*, 2000). A ECA também promove a conversão direta da Ang II em Ang-(1-7) (Vickers *et al.*, 2002).

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

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

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

Quando microinjetada centralmente, a Ang-(1-7) pode apresentar efeitos antagônicos, dependendo da área e da quantidade do peptídeo que está sendo

infundido. Por exemplo, a microinfusão de Ang-(1-7) na região da medula ventro lateral rostral (RVLM) produz aumento da pressão arterial e taquicardia. Porém, quando microinjetada na região da medula ventro lateral caudal (CVLM), a Ang-(1-7) provoca queda da pressão arterial e da frequência cardíaca (Silva *et al.*, 1993).

Além dos efeitos já discutidos, a Ang-(1-7) também desempenha um importante papel no controle da pressão arterial agindo como um hormônio vasodilatador em inúmeros leitos vasculares (Gorelik *et al.*, 1998; Brosnihan *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2002), embora, menos freqüentemente, também produza vasoconstrição (Osei *et al.*, 1993). De fato, várias evidências reforçam a hipótese de que as principais ações do SRA na regulação da pressão arterial sejam dependentes de um balanço entre os efeitos da Ang II e os da Ang-(1-7) (Ferrario *et al.*, 1997), sugerindo um importante papel para a Ang-(1-7) no controle dos níveis pressóricos.

Recentemente foi descrito que a infusão de Ang-(1-7) promove um potente efeito vasodilatador em ratos anestesiados atuando sobre diferentes leitos vasculares (Sampaio *et al.*, 2003). Na maioria dos leitos vasculares estudados, o efeito vasorelaxante da Ang-(1-7) é completamente inibido pelo bloqueio da formação de NO. Da mesma forma, na ausência de endotélio funcional o efeito vasorelaxante da Ang-(1-7) também é abolido (Pörsti *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2002). Esses resultados sugerem que, na maioria dos leitos vasculares estudados, a Ang-(1-7) induz dilatação através da produção de NO endotelial. Acredita-se que o efeito vasodilatador desse heptapeptídeo possa ocorrer através da potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina (Pörsti *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1997), além da estimulação do seu receptor específico (Fontes

et al., 1994; Santos *et al.*, 2003), dependendo do leito vascular e da espécie animal estudada.

Vários trabalhos demonstram uma possível interação entre a bradicinina e a Ang-(1-7) ao nível vascular (Paula *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2000). A administração de Ang-(1-7), antes da infusão de bradicinina, potencializa o efeito vasodilatador induzido por esse último peptídeo. Esse efeito já foi descrito *in vivo* em animais normotensos (Paula *et al.*, 1995) e hipertensos (Fernandes *et al.*, 2001) e *in vitro* em artérias coronárias de cães (Le *et al.*, 1997), dentre outros. Além disso, também já foi demonstrado que, em alguns leitos vasculares, o efeito vasodilatador induzido pela Ang-(1-7) pode ser inibido pelo HOE 140, um antagonista específico do receptor B₂ da bradicinina (Porsti *et al.*, 1994; Bronsnihan *et al.*, 1996). Os mecanismos implicados nesses efeitos ainda não foram completamente elucidados. Um dos mecanismos sugeridos na literatura para explicar a interação entre esses dois peptídeos é através da modulação local da atividade da ECA pela Ang-(1-7) (Roks *et al.*, 1999; Tom *et al.*, 2001; Jaspard *et al.*, 1993). Sugere-se que a Ang-(1-7), inibindo a atividade da ECA, possa estar promovendo aumento nos níveis de bradicinina e esse pode ser um dos mecanismos através dos quais a Ang-(1-7) e a bradicinina se interrelacionam. Outros trabalhos sugerem ainda que a Ang-(1-7) poderia promover a potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina através da ressensibilização dos receptores B₂ (Tom *et al.*, 2001).

Atualmente sabe-se que boa parte dos mecanismos através dos quais a Ang-(1-7) promove seus efeitos ocorre por estímulo do seu receptor específico, o Mas. A existência de um receptor específico para a Ang-(1-7) foi evidenciada por Campagnole-Santos e colaboradores em 1992, observando que a Ang-(1-7) induzia um aumento significativo na sensibilidade do barorreflexo. Tallant e

colaboradores em 1997 visualizaram por ligação radioativa através de experimentos utilizando cultura de células endoteliais de aorta bovina, sítios específicos de ligação para a Ang-(1-7).

Recentemente experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que o receptor acoplado à proteína G, codificado pelo protooncogene *Mas*, é um receptor funcional para a Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003). Na ausência desse receptor, vários efeitos da Ang-(1-7) são abolidos. Além disso, também foi demonstrado que em cultura de células CHO (ovário de hamster chinês), transfectadas com *Mas*, a Ang-(1-7) apresenta alta afinidade de ligação. Essa ligação da Ang-(1-7) ao receptor *Mas* pode ser deslocada pelo antagonista específico, o A-779, mas não pelos antagonistas dos receptores AT₁ ou AT₂ da Ang II, CV11974 e PD123319, sugerindo que o A-779 é um antagonista específico do receptor *Mas*. (Tallant *et.al.*,1997)

2.4 Camundongo *Knockout Mas*

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

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

A Ang II foi considerada como um possível ligante para o receptor *Mas*, porém, Ambroz e colaboradores (1991) mostraram que o aumento de cálcio

intracelular induzido pela Ang II em células transfectadas com *Mas* era dependente da expressão do receptor AT₁ da Ang II, descartando, dessa forma, essa possibilidade. Porém, outros experimentos demonstraram que o receptor *Mas* modula a sinalização intracelular induzida pela estimulação dos receptores AT₁ (Von Bohlen und Halbach *et al.*, 2000), mantendo, dessa forma, a hipótese de que o *Mas* e as angiotensinas se interrelacionam.

Recentemente, foram desenvolvidos camundongos com deleção do protooncogene *Mas* (KO *Mas*) a partir do camundongo C57Bl/6 e do camundongo da linhagem FVB/N (Walther *et al.*, 1998), o que permitiu estudar a importância fisiológica da proteína codificada por esse gene.

Nos camundongos *knockout*, a expressão do mRNA para o *Mas* não está presente nos principais órgãos onde esse gene é expresso em camundongos adultos, como: coração, rins, testículos e cérebro (Alenina *et al.*, 2002).

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

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

(Walther *et al.*, 2000b). Nos animais KO Mas com background FVB/N foi observado, por Moura e colaboradores, que ocorre aumento significativo da pressão arterial e disfunção endotelial associada a microalbuminúria (dados não publicados).

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

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

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

Embora os mediadores implicados no efeito relaxante da Ang-(1-7) estejam parcialmente descritos, os receptores implicados nesse efeito ainda estão longe de serem elucidados. Além disso, o papel desse receptor no metabolismo nunca foi estudado; deixando perspectivas sobre o papel da Ang-(1-7) e do receptor Mas no controle metabólico do organismo.

2.5 TNF- α

Citocina é o termo genérico empregado para designar um grupo muito extenso de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), e fator de transformação de crescimento (TGF- β).

O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, além de participar na resposta imunológica e na etiopatogenia de algumas neoplasias, também está envolvido na gênese da resistência à insulina, por inibir a fosforilação de receptores de insulina (Uysal *et. al.*, 1994). Ele é expresso pelo tecido adiposo, e níveis elevados do mesmo são encontrados em todos os modelos de obesidade genética em roedores e em obesos humanos (Saghizadech *et. al.*, 1996). Esta citocina também se expressa em quantidades maiores nas células musculares isoladas de diabéticos tipo 2 (Saghizadech *et. al.*, 1996). Foi sugerido que o TNF- α atua como fator adipostático e que, na obesidade humana, parte deste efeito estaria envolvido nos mecanismos que levam à resistência à insulina. A ausência completa do TNF- α ou de seus receptores resulta em melhora significativa da sensibilidade à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta, hipotalâmica ou genética (Ventre *et. al.*, 1997; Uysal *et. al.*, 1994). Além de se registrar concentrações elevadas de TNF- α na obesidade, esta citocina aumenta a produção de endotelina-1 e de angiotensinogênio, refletindo a disfunção endotelial que pode ocorrer em obesos hipertensos. O TNF- α atua em sinergismo com outras citocinas durante a ativação de processos inflamatórios (Bédard *et.*

al., 1997), o que pode ser uma das explicações da associação entre obesidade, resistência a insulina e aterosclerose.

2.6 Leptina

A leptina é o produto do gene da obesidade (*ob*) que é expresso, predominantemente, nos adipócitos (Halaas et. al., 1995). Estudos em roedores sugeriram que a leptina age como um fator de sinalização do tecido adiposo para o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético e, assim, fazendo a homeostase do peso corporal e mantendo constante a quantidade de gordura (Caro et. al., 1996). A descoberta da leptina tem ajudado a esclarecer o papel dos adipócitos como sistema endócrino e de que modo ocorre a sinalização para a ingestão ou não de alimentos, bem como a regulação do metabolismo energético. Assim, a coordenação do balanço energético e do peso corporal envolve uma regulação entre a ingestão de alimentos e gasto de energia em resposta a sinais agudos (insulina e catecolaminas como a adrenalina) e crônicos (gravidez, desnutrição, inflamações, caquexia e leptina). Os níveis de leptina circulantes parecem estar diretamente relacionados com a quantidade de RNAm para leptina no tecido adiposo. Além disso, vários fatores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a transcrição dos genes da leptina em adipócitos. Por exemplo, ocorre diminuição de leptina em resposta a baixos níveis de insulina, havendo uma relação diretamente proporcional entre as concentrações desses hormônios. (Considine et al. 1996).

A propriedade inibidora do apetite deve-se ao mecanismo de sinalização deste no hipotálamo, estimulando a síntese de neuropeptídeos anorexigênicos como POMC (Proopiomelanocortina), α -MSH (Hormônio Estimulante de a-Melanócitos), CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina) e CART (Transcrito

Regulado por Cocaína e Anfetamina) que diminuem a ingestão de alimentos pela sensação de saciedade. Os neuropeptídeos anorexigênicos, por sua vez, inibem a síntese de neuropeptídeo Y (NPY), que estimula a ingestão de alimentos, inibe a termogênese e é diminuído por altos níveis séricos de insulina, promovendo aumento da lipogênese, síntese proteica e armazenamento de glicose. (Tritos et al. 1997).

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

A leptina também age nos tecidos periféricos. Assim, demonstrou-se em roedores, que a hiperleptinemia reduz a síntese de triglicerídeos e aumenta a oxidação dos ácidos graxos em ilhotas pancreáticas normais (Shimabukuro et al., 1997), levando a uma disfunção das células beta, deprivando-as do sinal lipídico necessário para a resposta insulínica a outros substratos (Koyama et al., 1997). Este achado, em conjunto com a observação de que a insulina estimula a secreção de leptina, sugeriu a possível existência de uma regulação retrógrada negativa entre a insulina e a leptina.

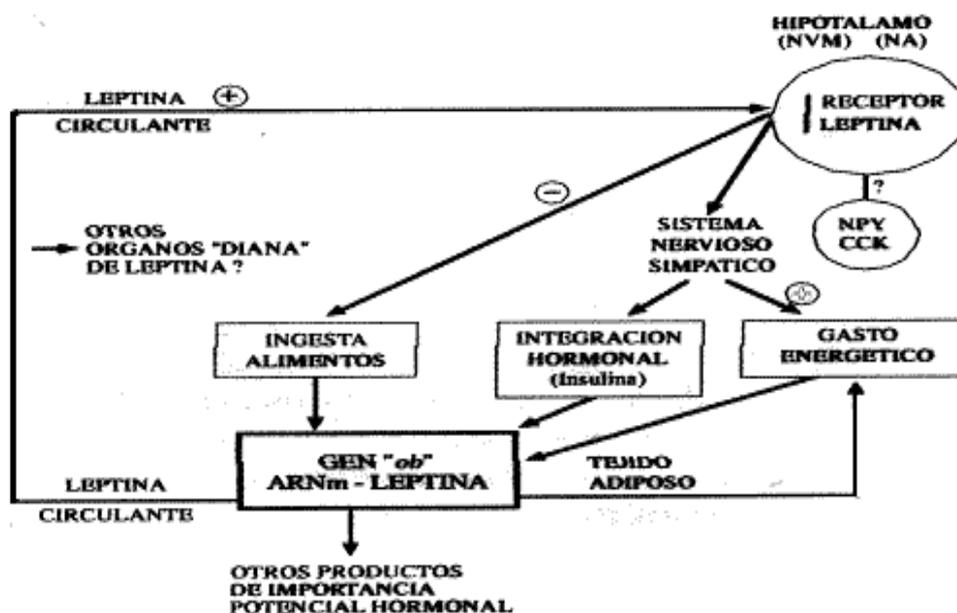


Figura 1- Esquema representativo do mecanismo hipotético de regulação da leptina. (Adaptado de Sánchez 1997).

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

2.7 Resistina

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

Em 2000, um grupo de pesquisadores liderados por Claire Steppan (Claire *et. al.*, 2001) da Universidade da Pensilvânia identificou no tecido adiposo um mediador que denominaram resistina (de resistência à insulina). Essa proteína,

ao que tudo indica, se torna a explicação mais consistente dos eventos que levam à resistência à insulina. Trabalhando com uma das tiazolidinedionas, a rosiglitazona, em várias linhas celulares de adipócitos, caracterizaram um novo RNAm expresso pelo tecido adiposo e que era suprimido por este fármaco. Assim demonstraram que a proteína codificada por este RNAm se expressava exageradamente em vários roedores obesos, e que as tiazolidinedionas reduziam sua secreção tanto *in vitro* como na corrente sangüínea de camundongos (Claire *et. al.*, 2001). Levantaram a hipótese que as tiazolidinedionas, pela sua ação sobre receptores nucleares gama ativados por proliferadores de peroxissomas, os PPAR- γ , modulariam a expressão de um gene específico do adipócito, a resistina, que estaria envolvido nas vias de sinalização moduladas pela insulina. Os PPAR- γ pertencem a uma família de fatores de transcrição induzidos durante a diferenciação dos adipócitos e que atuam na sensibilidade dessas células à insulina (Braissant, *et. al.*, 1996). Contudo, numerosas dúvidas ainda existem sobre a resistina. Não se sabe, por exemplo, qual seria a ação da resistina em outros alvos fisiológicos da insulina além dos adipócitos, como o fígado, músculo e cérebro; nem quais seriam as características de seu receptor e o papel da resistina na fisiologia normal. Entende-se menos ainda os mecanismos exatos de sinalização resistino-mediada. (Yoshimoto *et. al.*, 1999)

2.8 Adiponectina

A adiponectina (ApN) é uma adipocina secretada especificamente pelos adipócitos e circula em concentrações relativamente altas na corrente sangüínea. Ela desenvolve um papel fundamental na homeostase energética e na inflamação (Lyon *et. al.*, 2003). Essa proteína de 30-KDa é composta por uma porção N-terminal domínio colágeno e uma porção C-terminal domínio globular. O fragmento gerado (gApN) pela proteólise da ApN possui varias ações biológicas

(Fruebis *et. al.*, 2001). Dois tipos de receptores de adiponectina já foram caracterizados e medeiam suas ações, principalmente, via estimulação de AMPK, PPAR- α , e p38 MAPK. O AdipoR1, que possui alta afinidade por gApN, é abundantemente expresso em músculos esqueléticos. Já o AdipoR2, que possui afinidade moderada por ambas as formas de ApN, é predominante no fígado (Yamauchi *et. al.*, 2003). Ambos receptores estão presentes nos adipócitos, sugerindo que a ApN pode agir nessas células, possuindo assim ações tanto autócrinas quanto parácrinas.

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

Clinicamente foi documentada uma forte associação inversa entre níveis séricos de adiponectina e risco de doença arterial coronariana. A associação mostrou uma clara relação dose-resposta que persistiu mesmo após ajuste para fatores de risco convencionais, incluindo diabetes e índice de massa corpórea (IMC). A mais forte correlação ocorreu entre as concentrações plasmáticas de colesterol HDL, e apolipoproteína A1, sabidamente essencial na formação da

partícula de HDL. A função anti-aterogênica mais importante desta partícula é a participação no transporte reverso do colesterol, da circulação para o fígado onde é disponibilizado sob a forma de sais biliares.

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

2.9 Interação do sistema renina-angiotensina com o metabolismo

A síndrome metabólica, também conhecida como síndrome de resistência à insulina, é caracterizada pela coexistência variável de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão (Grundy SM *et al.*, 2004). Outros achados incluem estado pró-inflamatório, microalbuminúria e hipercoagulabilidade. O conjunto de fatores de risco que identificam a síndrome metabólica foi reconhecido, pela primeira vez, em 1983. Em 1988, Reaven introduziu o termo síndrome X e identificou a resistência à insulina, definida como a menor captação da glicose pelos tecidos periféricos, como o substrato fisiopatológico comum da síndrome. Outros sinônimos têm sido utilizados para denominar essa constelação de fatores de risco (dislipidemia, resistência à insulina, hipertensão e obesidade), tais como síndrome plurimetabólica, síndrome da resistência à insulina, quarteto mortal, dentre outros (Miranda *et al.*, 2005).

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu o termo unificado síndrome metabólica, pois os estudos não identificaram a presença de resistência à insulina como único fator causal de todos os componentes da síndrome. A

patogênese da síndrome é multifatorial, sendo a obesidade, a vida sedentária, a dieta e a interação com fatores genéticos os responsáveis pelo aparecimento da mesma. Mutações e polimorfismos nos genes associados com resistência à insulina, anormalidades nos adipócitos, hipertensão e alterações lipídicas ocupam papel central na etiopatogenia da síndrome.

A dislipidemia, uma das principais alterações encontrada na síndrome metabólica, é caracterizada pelo aumento dos ácidos graxos livres circulantes e pela elevação dos triglicérides (conseqüente à reesterificação inadequada) que pode ser parcialmente determinada por falha dos adipócitos em reter os ácidos graxos livres em seu interior, aumentando assim seu fluxo para a circulação (Singh B.M. *et. al*, 2003). Esse mecanismo é facilitado pela resistência à insulina. Essas alterações aumentam a liberação de ácidos graxos livres para o fígado.

Na resistência à insulina, o fígado promove a reesterificação desses ácidos graxos, formando triglicérides, os quais são liberados na circulação na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Miranda *et. al.*, 2005).

Cassis e colaboradores (1993) apontaram que a angiotensina II teria um papel potencial significativo na termogênese induzida pelo frio. Além disso, ratos obesos fa/fa mostram reduzida atividade da renina plasmática e menor densidade dos receptores AT₁ no tecido adiposo, que se associam a modesta resposta do peptídeo quanto a liberação de norepinefrina, quando comparados aos animais controle (Cassis LA *et. al.*, 1996). Sabe-se que a infusão crônica de angiotensina II é acompanhada de importante redução no peso e na ingestão de alimentos, possivelmente pela maior liberação de norepinefrina, o que pode contribuir para o aumento da atividade metabólica e elevação do dispêndio energético (Cassis LA *et. al.*, 1998b).

Vários componentes do SRA foram descritos no tecido adiposo. (Massiera et. al., 2001). Estudos realizados nos últimos anos mostram que o SRA modula de forma importante o metabolismo e a função endócrina nesse tecido. No quadro de síndrome metabólica já foram descritos o aumento da atividade da renina plasmática, maior nível plasmático de angiotensinogênio, maior atividade da ECA, e maior nível plasmático de aldosterona (Engeli et. al., 2000). Os níveis de mRNA de AGT são 60% maiores no tecido adiposo do que no fígado, que é considerado principal fonte de AGT (Harp et. al., 1995). Além disso, a expressão de AGT é mais elevada em adipócitos viscerais do que em adipócitos subcutâneos tanto em ratos como em humanos (Safonova et. al., 1997). Os adipócitos de ratos e de humanos apresentam dois subtipos de receptores angiotensinérgicos, AT₁ e AT₂, embora ainda não estejam claras as funções específicas desencadeadas por esses receptores nessas células. In vivo, a expressão do gene para o receptor AT₁ no tecido adiposo parece ser dependente da idade, uma vez que foi observada uma menor densidade de receptores AT₁ nos ratos SD idosos e obesos quando comparados com ratos jovens e magros. Os sítios de afinidade entre o receptor AT₁ e a angiotensina II têm cinética semelhante aos de outros órgãos alvo do peptídeo sendo a densidade desse receptor no tecido adiposo semelhante à do coração (Cassis LA et. al., 1998). Estudos utilizando cultura de células adiposas mostraram que o AGT e a Ang II participam da regulação e diferenciação do fenótipo do adipócito. É provável que o aumento no conteúdo de triglicerídeos e da atividade de duas enzimas, a sintetase de ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, sejam mediadas pela Ang II, mostrando que esse peptídeo controla a adiposidade pela regulação da síntese e armazenamento de lipídios. (Safonova et. al., 1997)

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

Estudos experimentais sugerem que o SRA do tecido adiposo, regulado por fatores hormonais e nutricionais, é influenciado pelo grau de obesidade, pelo fato de que a Ang II pode modular o fluxo sanguíneo, por fatores de crescimento e pelo metabolismo local. Assim, a ativação do SRA pode determinar efeitos deletérios locais e sistêmicos em obesos e pode contribuir assim para o surgimento da HAS e da resistência à insulina. A resistência à insulina, por sua vez, está associada com o aumento da liberação de ácidos graxos livres, que são convertidos no fígado em triglicerídeos e secretados em partículas lipoprotéicas de muita baixa densidade (VLDL).

A hipertrigliceridemia leva a um estado dislipidêmico e altamente aterogênico, através do aumento de síntese de partículas lipoprotéicas de baixa densidade (LDL), facilmente oxidáveis, e ao mesmo tempo, à redução das partículas lipoprotéicas de alta densidade (HDL) (Ginsberg *et. al.*, 2000). Tanto no estado de resistência à insulina quanto na síndrome metabólica, a disfunção endotelial pode ser evidenciada de maneira importante, sendo primordialmente acompanhada de redução da biodisponibilidade do NO.

Por sua vez, a redução de NO, resulta em maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como os íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Os íons

superóxido inativam o NO para formar o peróxidonitrito, que por sua vez, desacopla a óxido nítrico sintase endotelial pela oxidação de seu co-fator, tetrahydrobiopterina, o que resulta em produção de mais O^{2-} em vez de síntese de NO. Esta cascata de eventos é denominada de estresse oxidativo. Desta forma, a redução de NO e de outros fatores relaxantes derivados do endotélio pode ser acompanhada pelo aumento da produção de endotelina, prostanóides vasoconstritores e Ang II (Schiffrin *et. al.*, 2004).

A redução da biodisponibilidade do NO foi confirmada em modelos experimentais de resistência à insulina, onde foi observado que existe uma correlação entre a sensibilidade à insulina e a produção basal de NO em indivíduos saudáveis (Singh B.M. *et. al.*, 2003). Indivíduos insulino-resistentes apresentam resposta vasodilatadora endotélio-dependente prejudicada e a disfunção endotelial pode ser também detectada em indivíduos saudáveis com primeiro grau de parentesco com os indivíduos diabéticos do tipo 2 (Shinozaki *et. al.*, 2004). Portanto, a disfunção endotelial parece ser um elo comum entre a HAS, diabetes mellitus e a síndrome metabólica.

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

Além da contribuição do SRA, principalmente via Ang II, na gênese da síndrome metabólica já descrita acima, interações em diferentes níveis desse

sistema com a insulina são implicadas como fator fundamental para o desenvolvimento da DM tipo II e síndrome metabólica.

Os estudos na literatura sugerem que a Ang II, via receptor AT_1 pode modular as ações da insulina. Assim, a ativação do SRA induz o aparecimento de resistência às ações metabólicas da insulina, provocando hiperglicemia e elevação dos níveis de colesterol (VLDL), triglicérides, e potencializando o efeito proliferativo da insulina. Além disso, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia ativam o SRA através do aumento da expressão de AGT, Ang II e receptores AT_1 , que, por sua vez, podem induzir o aparecimento de hipertensão arterial, disfunção cardiovascular e renal (Engeli *et. al.*, 2003).

Assim, substâncias produzidas pelo tecido adiposo podem interagir com o SRA reforçando suas ações, participando desta forma das alterações cardiovasculares e renais associadas à obesidade e à síndrome metabólica (Blaj *et. al.*, 2003).

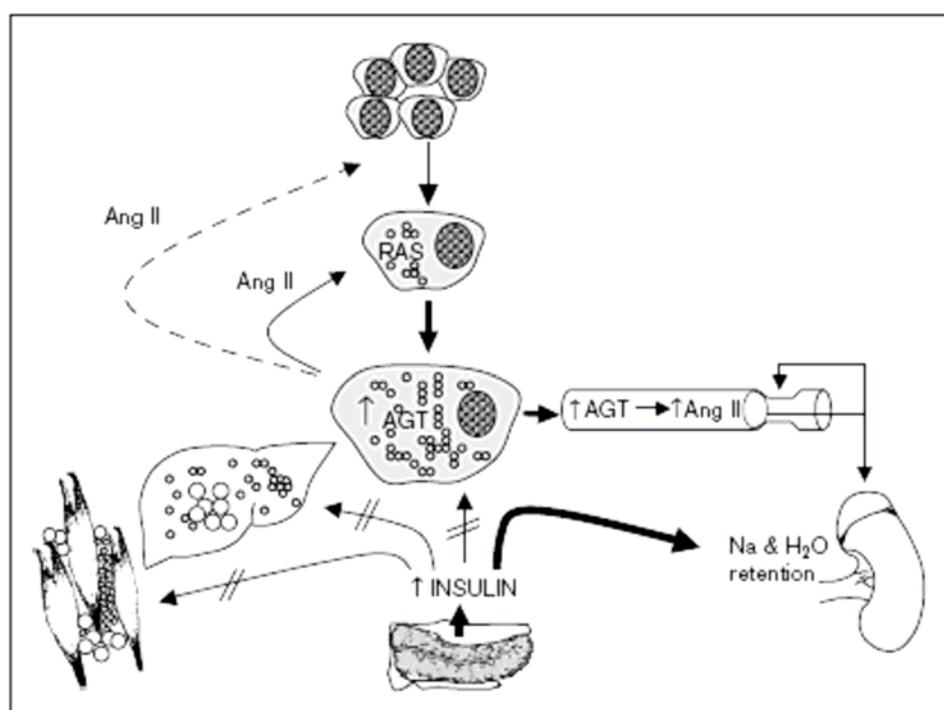


Figura 2- Alterações patofisiológicas associadas com a ativação do SRA do tecido adiposo na obesidade. Todos os componentes do SRA estão presentes no tecido adiposo. A expressão de AGT está aumentada na obesidade, o que leva ao super-aumento da concentração de Ang II no tecido adiposo, que por sua vez

induz a inibição da diferenciação do pré-adipócito e promove o acúmulo de triglicérides nos adipócitos maduros devido ao seu efeito antilipolítico. O aumento de adipócitos maduros repletos de triglicérides diminui a sensibilidade insulínica do tecido adiposo. Supõe-se que o desvio do fluxo de moléculas de triglicérides para o fígado e para o músculo esquelético (hipótese da lipotoxicidade), possa gerar resistência a insulina. A hiperinsulinemia favorece a ativação simpática e a retenção de sódio e água (resistência insulínica seletiva). Através da hiperinsulinemia ocorre aumento dos níveis plasmáticos de angiotensinogênio devido à hipersecreção do adipócito que ocorre na obesidade: isso pode ser o fator responsável pelo aumento da produção de Ang II com subsequente vasoconstrição, elevação da retenção de sódio e água, levando a um quadro de hipertensão. As linhas contínuas denotam ações estimulatórias e as linhas pontilhadas denotam ação inibitória. AGT, angiotensinogênio; Ang II, angiotensina II; RAS, sistema renina–angiotensina (Adaptado de Strazzullo et. al., 2004).

2.10 Mecanismos moleculares que podem correlacionar o SRA à SM

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

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

Recentemente, foi demonstrado que além da via clássica dependente de cálcio, a formação de óxido nítrico pode ser modulada através da fosforilação direta de aminoácidos específicos da sintase de NO endotelial. A fosforilação da serina 1177, pela proteína quinase B/Akt, aumenta a atividade enzimática e a produção de NO (Fulton *et. al.*, 1999). Alguns dados na literatura sugerem que a Ang II agindo em receptor AT₁ inibe a ação vascular da insulina interferindo na cascata da PI3K, reduzindo a disponibilidade de NO. Essa alteração na via PI3K também altera utilização e transporte da glicose. Também já foi demonstrado que o aumento dos níveis de Ang II está associado à alteração no GLUT4. Sampaio (2007) mostrou que o eixo Ang-(1-7)/Mas, ativa a via da AKT, que por sua vez pode inibir a via MAPK estimulada pela insulina.

No entanto, não existe nenhum dado sobre a possível influência do eixo Ang-(1-7)/Mas, no metabolismo glicêmico e lipídico.

3- OBJETIVOS

Gerais

Estudar as conseqüências da deleção genética do receptor de angiotensina-(1-7), Mas, no metabolismo glicídico e lipídico de camundongos da linhagem FVB/N e os mecanismos envolvidos nas possíveis alterações.

Específicos

- Comparar o peso corporal e o peso de diferentes tecidos entre animais KO-Mas e seus controles WT FVB/N, bem como avaliar possíveis alterações na ingestão alimentar;
- Estudar a regulação glicêmica nos animais KO-Mas, através de testes de sensibilidade insulínica e tolerância a glicose, bem como avaliar os níveis glicêmicos durante o jejum;

- Averiguar os níveis plasmáticos lipídicos, dosando especificamente os níveis de triglicérides, colesterol total e HDL;
- Avaliar possíveis alterações na expressão de genes de citocinas e hormônios relacionados a processos metabólicos e inflamatórios;
- Estudar os efeitos da deleção do receptor Mas na expressão gênica do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo.
- Comparar a histologia dos adipócitos epididimais entre os animais KO-Mas e seus controles.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados animais *knockout* para o receptor Mas FVB/N (KO Mas) (Walther et. al., 1998) e seu controle WT FVB/N (WT); com matrizes produzidas no Max-Delbrück-Center For Molecular Medicine (Berlin-Buch, Germany), com idade de aproximadamente 10 semanas de vida. Todos os camundongos receberam dieta comercial, tiveram livre acesso à água *ad libitum*, como também foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h) com temperatura variando entre $25 \pm 2,0$ °C.

4.2 Amostras de sangue

Após jejum de 10 a 12 horas amostras de sangue foram retiradas, por exangüinação pela aorta abdominal em microtubos, após aplicação de anestesia intraperitoneal de uma solução de ketamina (130mg/kg) e xilazina (0,3mg/kg). O

soro foi separado, por centrifugação a 3500 rpm / 10 minutos, em centrífuga de mesa (Fanem Centrimicro 243).

4.3 Peso Corporal e peso adiposo

Para determinação do peso corporal os animais KO-Mas e WT FVB/N com 10 semanas foram pesados logo antes dos experimentos.

Para avaliação do peso do tecido adiposo os animais foram pesados e anestesiados com Ketamina/Xilasina, com posterior sacrifício através de incisão na aorta abdominal (como descrito). O tecido adiposo epididimal e o retroperitoneal foram retirados e pesados em seguida. O peso do tecido adiposo foi então corrigido pelo peso corporal e construiu-se assim um gráfico de porcentagem de peso corporal dos animais.

4.4 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar foi medida durante uma semana, com os animais sendo colocados em gaiolas individuais. Diariamente, no mesmo horário, o peso da comida foi mensurado em balança semi-analítica, subtraindo-se o valor obtido após 24 horas do peso inicial. A massa de comida ingerida diariamente foi corrigida pelo peso corporal. A média dos valores encontrados é apresentada na figura 5.

4.5 Determinação dos níveis plasmáticos de leptina e adiponectina

Os níveis séricos de leptina (Linco Research® , Missouri USA) e adiponectina (AdipoGen®, Seoul Korea) foram avaliados utilizando kits de ELISA específicos, de acordo com as especificações do fabricante.

4.6 Determinação dos níveis de colesterol total

Os níveis de colesterol total foram medidos de acordo com o método da colesterol oxidase (Allain et al., 1974), utilizando-se kit comercial da empresa Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima em 505 nm. Os níveis de colesterol no soro dos animais foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com Fazio et al. (1997). Em resumo, 10 µL das amostras de soro foram diluídas em água destilada (1:100), a fim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. À diluição foram adicionados 100 µL de reagente de colesterol total. Após um período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca (Thermo Plate).

4.7 Determinação de colesterol HDL

Os níveis de colesterol HDL no soro foram dosados por meio do kit enzimático Doles, Brasil. O princípio se baseia na precipitação seletiva de LDL e VLDL por polietilenoglicol tamponado, restando apenas a fração HDL no sobrenadante. Este foi separado para a dosagem de HDLc da seguinte forma: em uma microplaca de 96 poços, 10 µL da amostra foram adicionados a 200 µL do reagente de cor Colesterol 250 Doles/Colesterol Enzimático Líquido Doles. Após uma incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca (Thermo Plate).

4.8 Determinação dos níveis de triglicerídeos

Os níveis de triglicerídeos séricos foram medidos de acordo com o método enzimático colorimétrico (Fossati & Prencipe, 1982), utilizando kit comercial da empresa Doles, Brasil. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica, produzindo glicerol livre, fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase que, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase, do reagente fenólico (p-clorofenol) e da 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado, com máximo de absorção a 500 nm.

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

4.9 Histologia de tecido adiposo

O tecido adiposo epididimal foi retirado e fixado em Bouin. Após 24 horas o tecido foi transferido para uma solução de álcool etílico 70% onde permaneceu até o momento da inclusão em parafina. Foram feitos cortes de 7 μm de espessura em micrótomo e montagem em lâminas de vidro. Cada lâmina teve um total de 3 cortes retirados do bloco de parafina com uma distância mínima de 20 μm . As lâminas foram coradas pelo método de HE (hematoxilina-eosína). A análise foi feita em microscópio acoplado à câmera digital em um aumento de 20x. Foram selecionados três campos por corte nos quais se contou todos os adipócitos existentes na área, medindo-se o diâmetro de 20 adipócitos em cada campo. Fez-se a média dos resultados encontrados para cada camundongo para realização da análise.

4.10 Genotipagem

Para confirmação da deleção do receptor Mas nos animais Knock-out realizou-se extração do DNA genômico seguido de PCR.

4.10.1 Extração do DNA genômico:

Cada animal foi identificado e em seguida cortou-se um pequeno pedaço da ponta de sua cauda. Em um microtubo foram adicionados 100 μ l de tampão com 10 μ l de proteinase-K na concentração de 20mg/ ml, juntando-se ao tecido coletado. Incubou-se o produto à temperatura de 55°C por duas horas, ou até que tivesse ocorrido total digestão do tecido.

Em uma próxima etapa adicionou-se 750 μ l de tampão Tris-EDTA 1X, e incubou-se novamente a amostra por 10 minutos à temperatura de 95°C.

Do produto final foram utilizados 2 μ l para realização do PCR.

4.10.2 PCR e detecção de produtos amplificados em gel de agarose

Foram utilizados “*primers*” específicos para o DNA do receptor Mas de camundongos. Análises dos pares de bases foram executadas através do programa específico BLASTN, sintetizados pela empresa Invitrogen® (Quadro 1) e aliquotados na concentração de 150 μ M e guardados em freezer a -20° C. Uma subsequente diluição para 10 μ M foi necessária.

A amostra da etapa anterior (2 μ l) foi utilizada como fita molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume final de 50 μ l em tubos resistentes a temperaturas elevadas (*Hot start*) com os seguintes reagentes: 1 μ L (10 μ M) de cada primer (*sense* e *anti-sense*), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 2 μ l de MgCl₂ 50mM, dNTPs (Deoxinucleotídeos trifosfato-: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,2 mM) e 2,5 UI de *Taq DNA polimerase*. Para o processo de ciclagem térmica, realizou-se

desnaturação inicial por 4 minutos a 94 °C seguida de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento por 30 segundos a 59 °C e extensão por 1 minuto a 72 °C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72 °C (extensão final) após o término do último ciclo. Realizou-se também PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação (branco). Uma alíquota de 8 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,64 µg/mL). As bandas de amplicons foram visualizadas em transiluminador sob luz ultra-violeta para verificação da presença ou ausência de amplificação. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de massa molecular.

Quadro 1- *Primers* e condições experimentais utilizadas para a PCR do Mas

| Alvo | Seqüência (5' para 3') | | Temperatura de anelamento (°C) | Ciclos |
|------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------|
| | Sense | Antisense | | |
| Mas | ACT GTC GGG CGG TCA TCA TC | GGT GGA GAA AAG CAA GGC GA | 59 | 35 |

4.11 Retrotranscrição e Real Time PCR

4.11.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método “guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio”. Depois de completada a idade e passadas duas semanas dos testes glicêmicos, os camundongos foram sacrificados e, imediatamente, os órgãos de interesse foram removidos, sendo congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tubos plásticos de 5 mL contendo o reagente TRIzol® (0,1 g de tecido/1,0 mL do reagente extrativo; Invitrogen laboratories, USA), utilizando-

se um homogeneizador de tecido (PowerGen, 700. Fisher, USA). Os recipientes plásticos contendo o homogenato foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio (Merck®). Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso por 5 minutos a 4 °C, sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em tubos para microcentrífuga, com subsequente adição de 0,5 mL de isopropanol. O material foi levemente agitado e mantido em repouso a 4 °C por 10 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, à mesma temperatura utilizada anteriormente, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70 %, gelado (solução manufaturada em água tratada com dietil-pirocarbonato - DEPC), agitando-se novamente. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente até secagem das amostras. A redissolução do RNA total foi realizada com adição de 0,05 mL de água tratada com DEPC.

4.11.2 Eliminação de moléculas de DNA genômico da amostra de RNA total

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

4.11.3 Quantificação do RNA total

Após os procedimentos descritos anteriormente, as amostras de RNA total foram diluídas 50X e estimou-se a concentração em espectrofotômetro a 260 nm (HITACHI® UV 160 A). Para o cálculo da concentração do nucleotídeo, utilizou-se

a seguinte equação: $[RNA_{total}] = A_{260} \times 40 \times \text{Fator de diluição}$, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$.

4.11.4 RT (Transcrição Reversa)

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada num volume final de reação de 30 μL utilizando-se 1 μg de RNA total, 0,2 μg de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH 8,3; KCl 68 mM), 5 μl de MgCl_2 50 mM, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 UI de transcriptase reversa. Reagentes da empresa Promega[®] Corporation (USA). O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado em termociclizador durante um período de 60 minutos de incubação a 37 °C. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min.

4.11.5 PCR Quantitativa

As reações de PCR quantitativa foram feitas utilizando “*primers*” específicos para o cDNA dos genes de interesse. A análise dos pares de bases foi executada através do programa específico BLASTN, sintetizados pela empresa Invitrogen[®] (Quadro 2). Alíquotas na concentração de 150 μM foram feitas e guardados em freezer a -20° C. Uma subsequente diluição para 1nmol/ μl foi necessária para uso. Os *primers* do gene utilizado para normalização da reação (controle endógeno), foram de HPRT (Quadro 2).

O cDNA obtido da etapa de RT (2 μl) foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR. As reações de PCR quantitativa tiveram um volume final de 20 μl e foram feitas em duplicatas, utilizando 19 μl do Máster Mix de SYBR Green (Applied Biosystem), 2 μl de cada *primer* na concentração de 1nmol/ μl , e 2

μ l de cDNA. O aparelho para reação foi o ABI Prism 7000 (Applied Biosystem, EUA), sendo realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60°C.

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

| Alvo | Seqüência (5' para 3') | | Temperatura de anelamento (°C) | Ciclos |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------|
| | Sense | Antisense | | |
| TNF- α | CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A | TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC | 60 | 45 |
| TGF- β | GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC | TGA CGT CAC TGG AGT TGT AGG G | 60 | 45 |
| AGT | GAC GTG ACC CTG AGC AGT CC | TGA GTC CCG CTC GTA GAT GG | 60 | 45 |
| HPRT | GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT | GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C | 60 | 45 |

4.12 Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais os tecidos, previamente removidos e estocados no freezer -80°C, foram homogeneizados em 200 μ l de tampão de lise (1% Triton X-100, 0,15M NaCl, 20mM de Tris HCl, pH 7.0, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, , 4 μ g/ml de leupeptina, 4 μ g/ml de aprotinina, 1mM de orthovanadato de sódio, 0,5 mM PMSF). Após centrifugação as amostras foram incubadas sobre o gelo por 30 minutos e em seguida o lisado foi coletado e centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C em uma centrífuga Eppendorf modelo 5417R. O sobrenadante foi coletado, e a concentração das proteínas totais determinada em espectrofotômetro através do Kit Brada Lord.

4.13 Western Blotting

Trinta μ g dos extratos protéicos foram fracionados em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 12% a 100V por 1,5 h. Após a corrida eletroforética

as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram então coradas com "Ponceau" para verificar a eficiência da transferência e para confirmar a quantidade de proteínas em cada canaleta. Após esta etapa as membranas foram lavadas com Tris-Base 1M pH 7,6 (1x) contendo 0,1% de Tween (TBS-T) até se retirar todo o ponceau. Em seguida as ligações não específicas foram bloqueadas com TBS 1x, contendo 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário 1/1000 em TBS-T contendo 1% de leite em pó, por 18 horas a 4°C. Foram utilizados anticorpos primários comerciais para todas as proteínas testadas. As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti coelho diluído em TBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado. Após este tempo as membranas foram lavadas mais três vezes com TBS-T e incubadas por 5 minutos com solução reveladora ECL. O excesso da solução foi retirado e as membranas foram expostas contra filme de raio X por diferentes tempos. Os filmes foram revelados utilizando-se soluções reveladoras e fixadoras (Kodac), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.14 Testes de Tolerância à Glicose e Sensibilidade Insulínica

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

O teste de sensibilidade insulínica foi realizado pela manhã, com os animais no estado alimentado, através da aplicação intraperitoneal de 0,75U de insulina/kg de peso corporal. Com um pequeno corte na ponta da calda do animal, coletou-se uma gota de sangue para verificação da glicemia, no momento anterior à aplicação de insulina e com 15, 30 e 60 minutos após a aplicação. O

aparelho utilizado para leitura glicêmica foi o Accu-Chek® Advantage (Roche).

Com os resultados construiu-se uma curva de glicemia pelo tempo.

O teste de tolerância à glicose foi realizado pela manhã, com os animais em jejum de 12 horas, através da aplicação intraperitoneal de 2 g de glicose/kg de peso corporal. Com um pequeno corte na ponta da cauda do animal, coletou-se uma gota de sangue para verificação da glicemia, no momento anterior à aplicação da glicose (glicemia de jejum) e com 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação. O aparelho utilizado para leitura glicêmica foi o Accu-Chek® Advantage (Roche). Com os resultados construiu-se uma curva de glicemia pelo tempo. (Lee K. et. al., 2003).

4.15 Análises estatísticas e expressão dos resultados

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

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

5- Resultados

5.1 Peso corporal e peso adiposo

A análise do peso corporal dos animais KO Mas e WT FVB/N, mostrou que não existe diferença entre os grupos (24.73 ± 0.349 vs 24.77 ± 0.236 no WT). A figura 3 ilustra os resultados obtidos.

Após retirada e pesagem do tecido adiposo observou-se aumento da massa adiposa, tanto epididimal (1.704 ± 0.152 vs 1.150 ± 0.126 no WT) (Figura 4 B) quanto retroperitoneal (0.6747 ± 0.0858 vs 0.3781 ± 0.0458 no WT)(Figura 4 A), nos animais KO Mas. A figura 4 mostra os gráficos da análise estatística do peso de ambos os grupos e uma foto ilustrativa do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal (Figura 4 C).

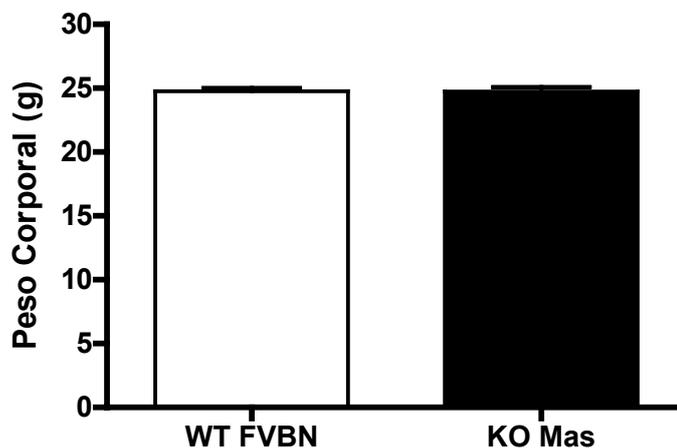


Figura 3 – Peso corporal em gramas do grupo de animais KO Mas (n=19) e do grupo WT FVB/N (n=15). Os dados representam média \pm EPM.

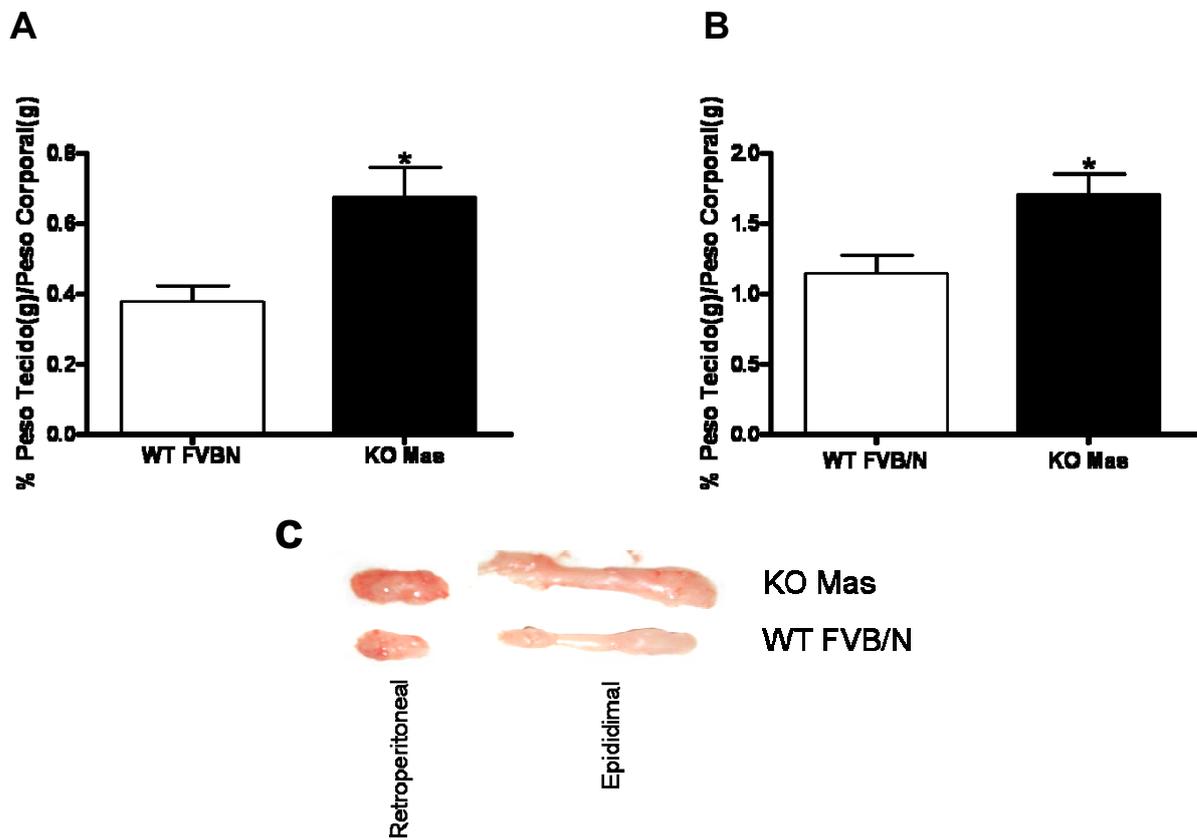


Figura 4 – Porcentagem da massa de tecido adiposo dos animais KO Mas (n=5) e WT FVB/N (n=5), pelo peso corporal. (A) Adiposo retroperitoneal (B) Adiposo epididimal (C) Foto ilustrativa do tecido adiposo de ambos os grupos. Os dados representam média \pm EPM.

5.2 Ingestão alimentar

A ingestão de ração (quantidade de comida ingerida por peso corporal) não diferiu entre os grupos (0.1785 ± 0.01098 vs 0.1762 ± 0.006781 g no WT), como mostrado na figura 5.

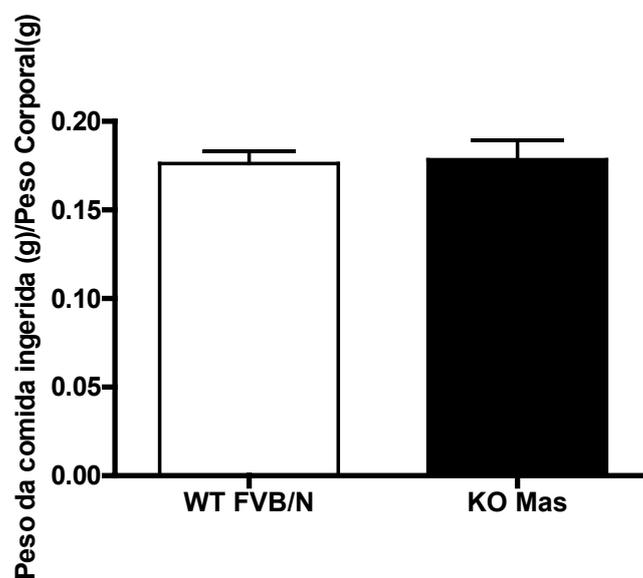


Figura 5 – Massa de comida ingerida corrigida pelo peso corporal dos animais Ko Mas (n=6) e WT FVB/N (n=6). Os dados representam média \pm EPM.

5.3 Histologia do tecido adiposo epididimal

Tanto a contagem do número de células por campo (Figura 6C) quanto a medida do diâmetro de vinte adipócitos por campo (Figura 6D) não revelaram diferença significativa entre os animais KO Mas e WT FVB/N, mostrando ausência de hipertrofia nas células adiposas dos animais KO Mas.

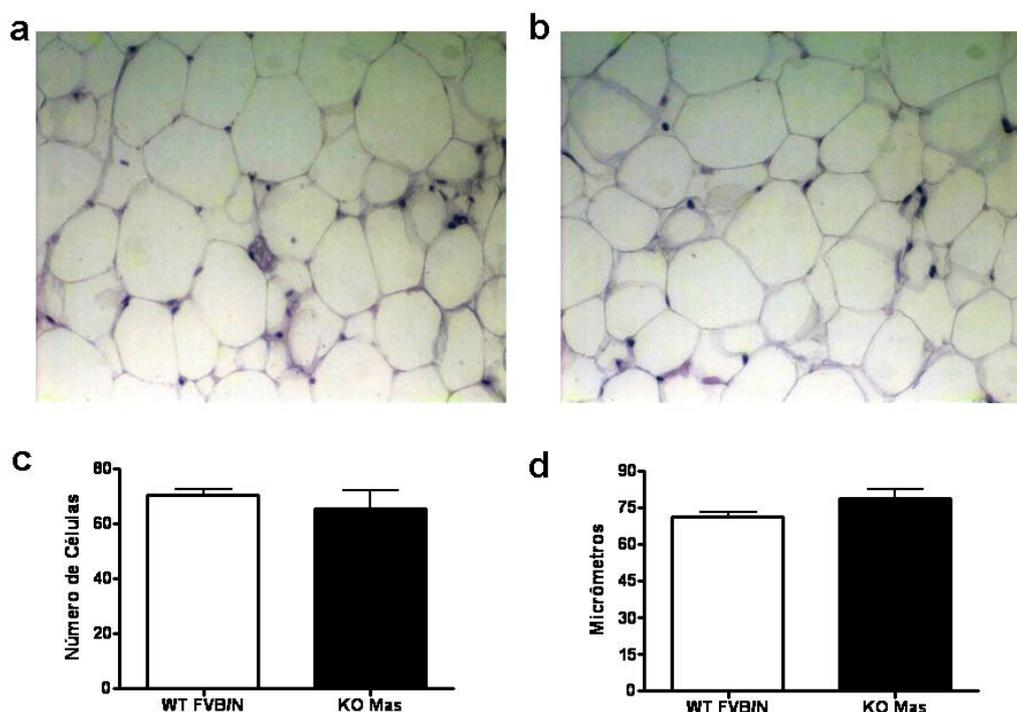


Figura 6 – Análise histológica (HE) do tecido adiposo epididimal dos animais KO Mas (n=3) e WT FVB/N (n=3). (A) Foto ilustrativa do tecido adiposo epididimal dos camundongos KO Mas. (B) Foto ilustrativa do tecido adiposo epididimal dos camundongos WT FVB/N. (C) Análise do número de células por campo. (D) Análise do diâmetro dos 20 maiores adipócitos por campo.

5.4 Perfil Lipídico

A dosagem plasmática do colesterol total (92.2 ± 3.65 vs 74.6 ± 5.67 mg/dl no WT), do HDL (74.50 ± 3.25 vs 42.26 ± 1.93 mg/dl no WT) e do triglicérides (70.6 ± 13.3 vs 41.4 ± 4.07 mg/dl no WT), mostrou que o animal KO Mas possui um quadro de dislipidemia, apresentando aumento, com relação ao grupo controle, em todas as análises (Figura 7).

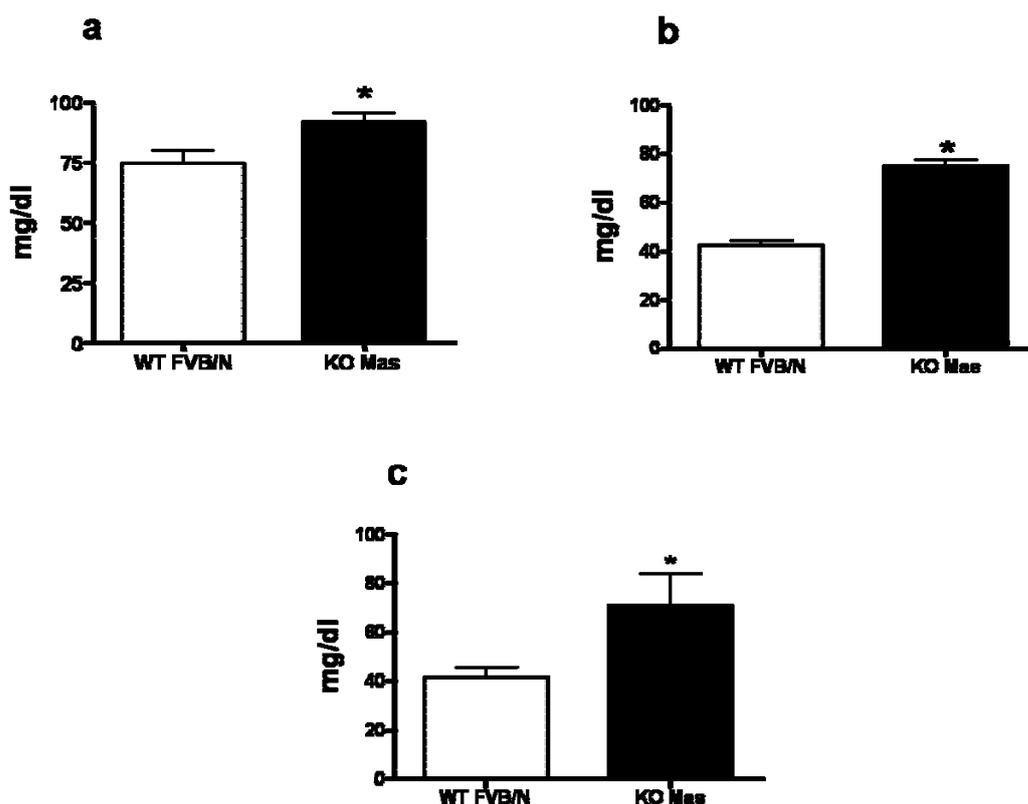


Figura 7 – Perfil lipídico dos camundongos WT FVB/N (n=6) e KO Mas (n=6). (A) Dosagem dos níveis plasmáticos de colesterol total (B) Dosagem dos níveis plasmáticos de HDL (C) Dosagem dos níveis plasmáticos de triglicérides. Os dados representam média \pm EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0.05$.

5.5 Perfil Glicêmico

O teste de tolerância à glicose mostrou que os animais KO Mas apresentam um quadro de menor tolerância a glicose que os seus controles WT FVB/N, com aumento acentuado na glicemia após injeção de glicose e menor queda durante o tempo experimental, como mostrado na figura 8A, onde se observa diferença significativa entre as curvas dos grupos analisados e nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. A glicemia basal de jejum também se mostra significativamente aumentada nos animais KO Mas (86.6 ± 6.43 vs 56.40 ± 4.98 mg/dl no WT) como mostrado na figura 8C.

O teste de resistência à insulina mostrou que os animais KO Mas apresentam maior resistência a insulina que o seu grupo controle WT FVB/N, com menor queda da glicemia após injeção de insulina intraperitoneal, com aumento mais rápido dos níveis glicêmicos durante o tempo experimental. A figura 8B mostra diferença significativa entre as curvas dos grupos analisados e 15 minutos após a injeção de insulina.

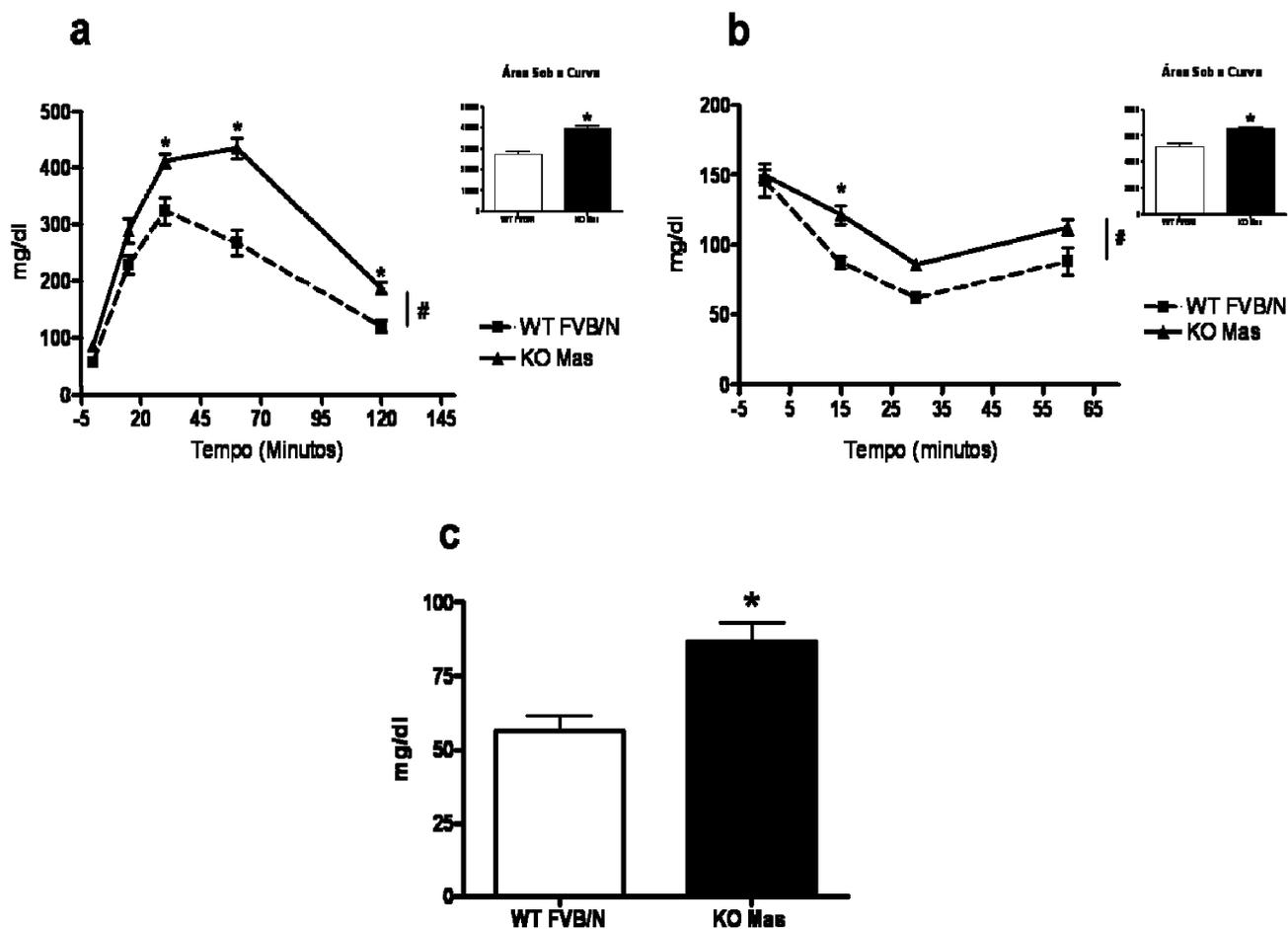


Figura 8 – Perfil glicêmico dos camundongos WT FVB/N (n=5) e KO Mas (n=5). (A) Teste de tolerância à glicose e gráfico da área sob a curva; (B) Teste de sensibilidade à insulina e gráfico da área sob a curva; (C) Glicemia de Jejum. Os dados representam média \pm EPM e foram analisados através do teste-T de Student (8C) e two-way ANOVA. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0.05$.

5.6 Western Blotting para Glut4 no tecido adiposo

Para se averiguar as possíveis causas das alterações metabólicas encontradas fez-se a análise da expressão do transportador Glut-4.

A análise da expressão protéica do transportador de glicose Glut4, no tecido adiposo epididimal, mostrou uma diminuição significativa (0.3535 ± 0.06091 vs 0.5992 ± 0.1143 no WT) na expressão desse receptor nos animais KO Mas com relação aos controles WT FVB/N (Figura 9).

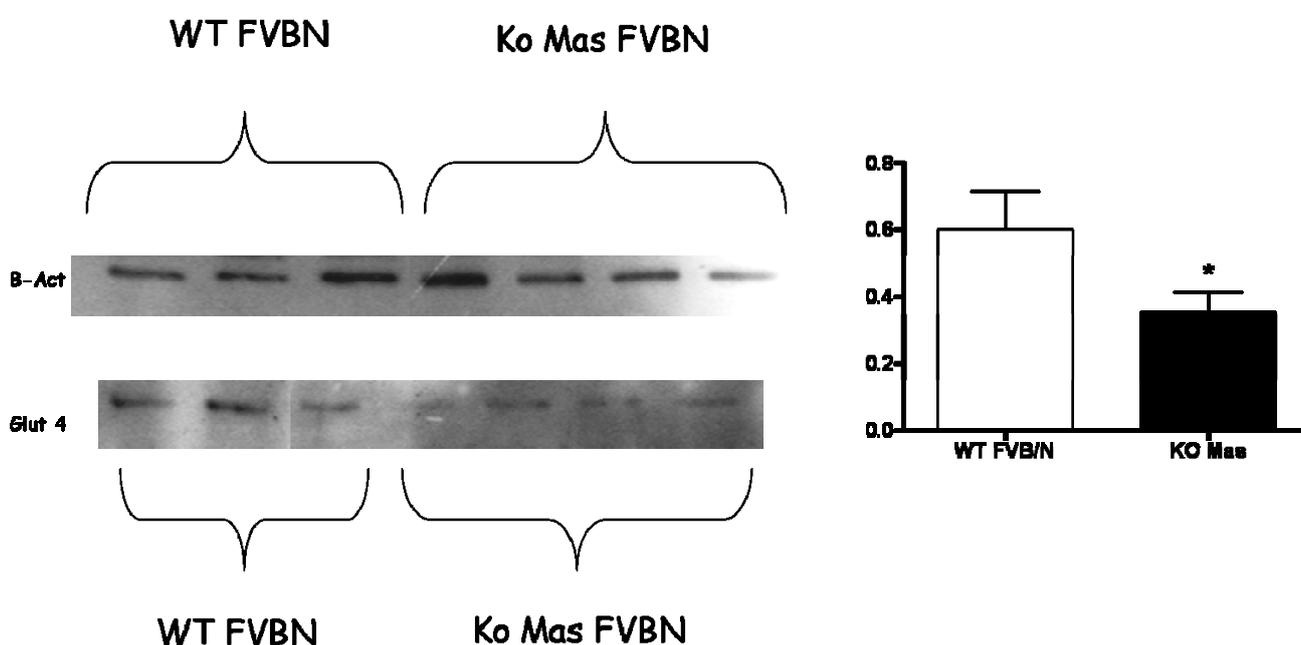


Figura 9 – Western Blotting de amostras de tecido adiposo epididimal de camundongos WT FVB/N (n=3) e KO Mas (n=4), com foto ilustrativa do filme de revelação do western blotting de ambos os grupos. Os dados representam média \pm EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0.05$.

5.7 Dosagem dos níveis plasmáticos de adipocitocinas

A dosagem plasmática dos níveis de leptina mostrou um aumento no grupo KO Mas quando comparado com seu controle WT FVB/N (1.280 ± 0.247 vs 0.735 ± 0.172 N=10 ng/ml no WT), como mostrado na figura 10. Quando comparamos o aumento da massa adiposa com o aumento dos níveis de leptina através da análise de Pearson (Figura 10B) observamos uma forte correlação tanto nos animais KO Mas ($p=0,0153^*$) quanto nos WT FVB/N ($p=0,0010^{***}$). Porém, quando os valores de leptina foram corrigidos pela massa adiposa epididimal os dois grupos apresentaram níveis semelhantes (Figura 10C).

Os valores encontrados na dosagem dos níveis séricos de adiponectina foram semelhantes entre os dois grupos (5.802 ± 0.442 vs 5.853 ± 0.538 $\mu\text{g/ml}$ no WT) como mostrado na figura 11A. Foi observada forte correlação entre o aumento da massa adiposa e os níveis de adiponectina (Figura 11B) nos animais KO Mas e WT FVB/N. Quando os valores de adiponectina foram corrigidos pela massa adiposa epididimal o grupo KO Mas mostrou uma produção prejudicada desse hormônio (7.420 ± 0.7169 vs 20.74 ± 6.485 $\mu\text{g/ml}$ no WT) como mostrado na figura 11 C.

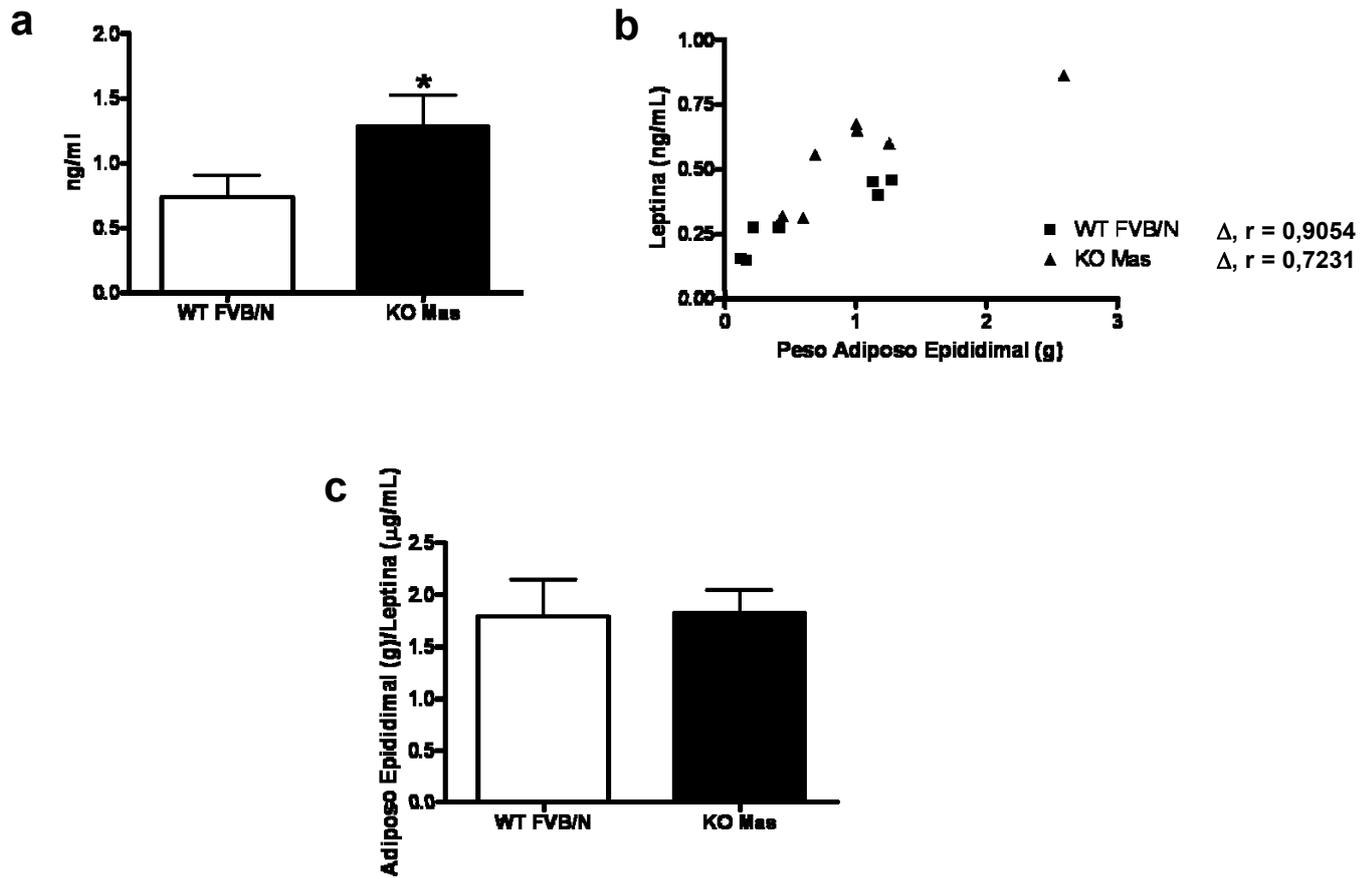


Figura 10 – Níveis plasmáticos de leptina nos camundongos WT FVB/N (n=10) e KO Mas (n=10). (A) Nível plasmático de leptina (B) Correlação entre o peso do tecido adiposo epididimal e os níveis séricos de leptina. (C) Razão entre a massa de tecido adiposo e os níveis de leptina por animal.

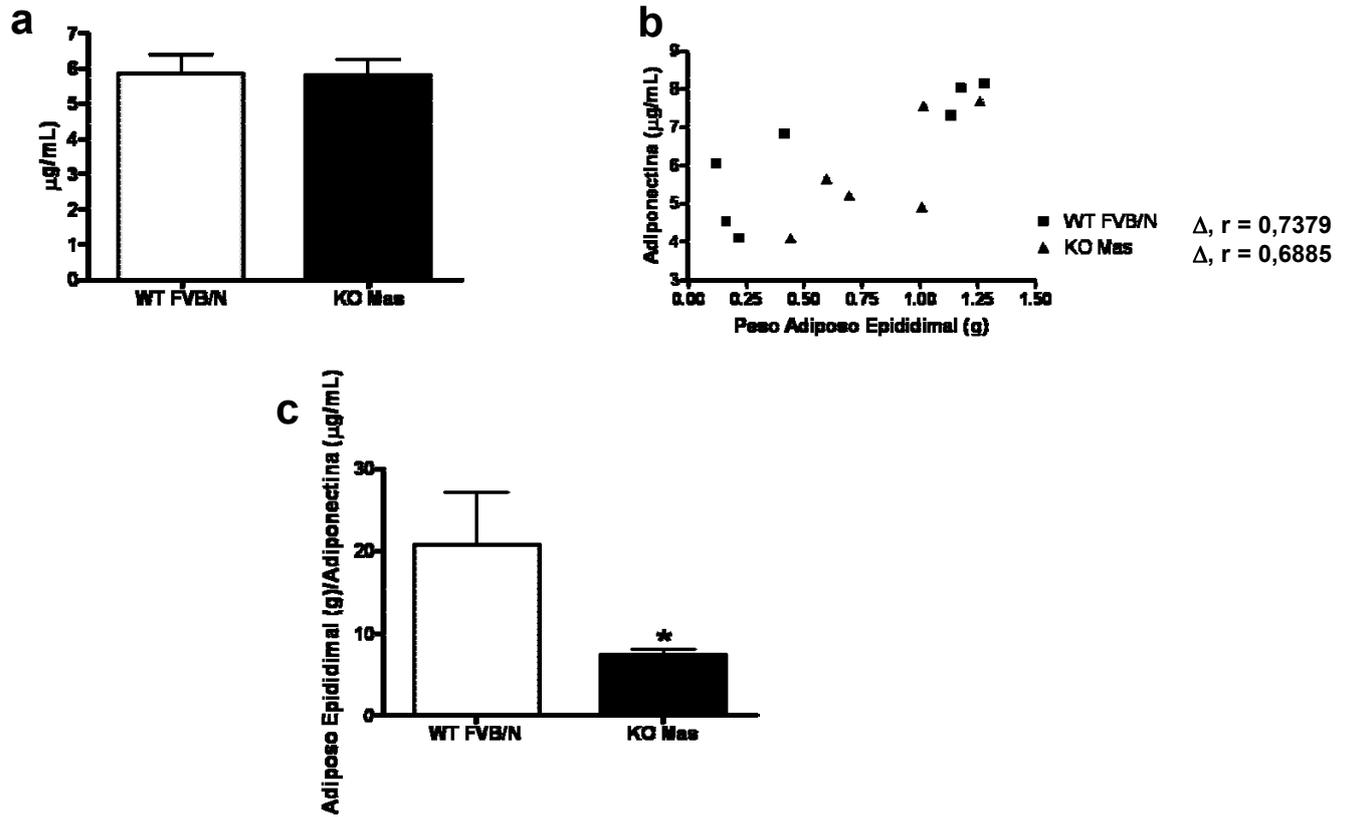


Figura 11 – Níveis plasmáticos de adiponectina em camundongos WT FVB/N (n=7) e KO Mas (n=7). (A) Nível plasmático de adiponectina (B) Correlação entre o peso do tecido adiposo epididimal e os níveis séricos de adiponectina. (C) Razão entre a massa de tecido adiposo e os níveis de adiponectina por animal.

5.8 Expressão gênica de angiotensinogênio, TGF- β e TNF- α por Real Time

PCR do tecido adiposo

A análise da expressão do mRNA para angiotensinogênio, TGF- β e TNF- α por PCR em tempo real no tecido adiposo epididimal, mostrou um aumento significativo na expressão de angiotensinogênio (2.156 ± 0.663 vs 0.858 ± 0.194 no WT) e TGF- β (2.034 ± 0.437 vs 0.8020 ± 0.088 no WT), sem alteração na expressão de TNF- α (1.049 ± 0.30 vs 1.026 ± 0.27 no WT), como mostrado na figura 12.

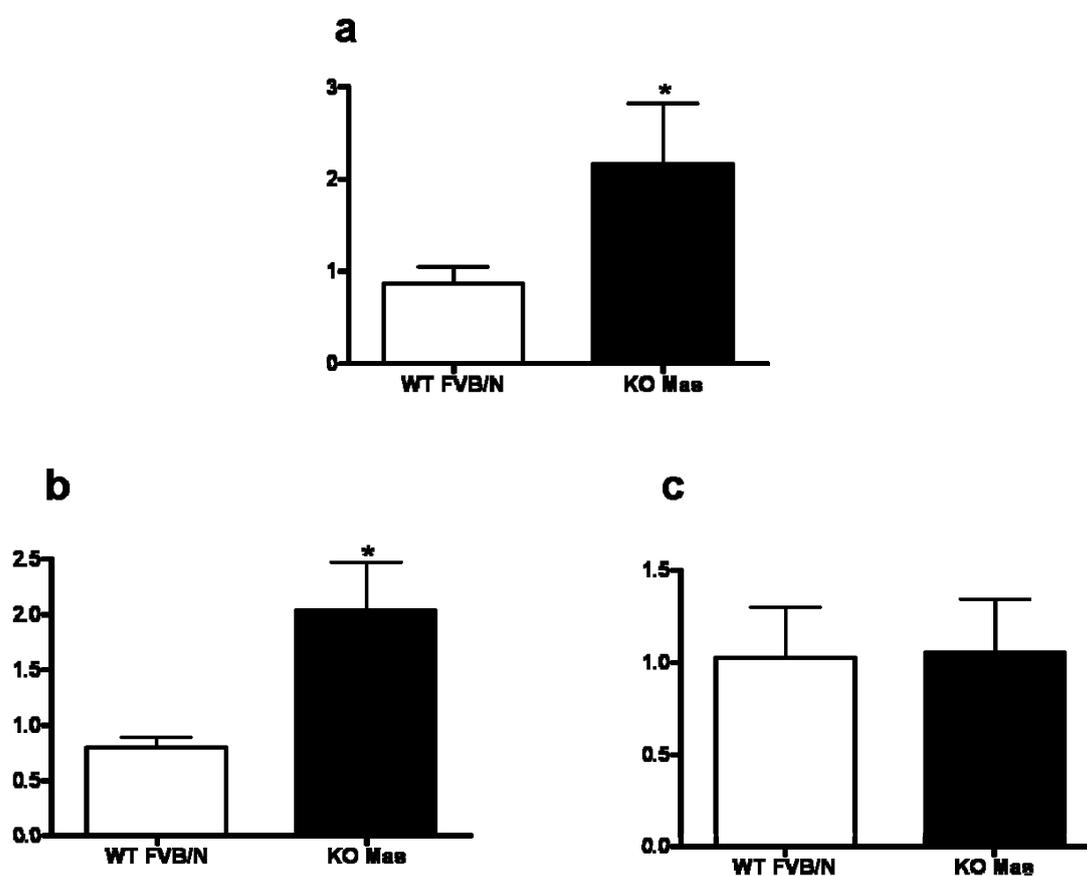


Figura 12 – Análise por PCR em tempo real do RNA extraído do tecido adiposo epididimal de camundongos WT FVB/N (n=6) e KO Mas (n=6). (A) Expressão de angiotensinogênio (B) Expressão de TGF- β (C) Expressão de TNF- α . Os dados representam média \pm EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0.05$.

6- Discussão

O tecido adiposo é um órgão endócrino complexo e importante que tem papel fundamental no metabolismo lipídico e glicídico (Strazzullo *et. al.* 2004).

A deleção genética de receptores é uma ferramenta que vem sendo muito utilizada para se avaliar o papel de peptídeos e enzimas. Dessa forma, o camundongo *knockout* para o receptor de angiotensina-(1-7), Mas, é uma importante ferramenta para a avaliação do papel desse peptídeo via receptor Mas na homeostasia. No presente estudo, procuramos avaliar as conseqüências da deleção genética do receptor Mas no metabolismo lipídico e glicídico.

Os resultados obtidos mostraram que os animais KO Mas apresentam um quadro de dislipidemia (aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides), menor tolerância a glicose com maior resistência a ação da insulina e aumento dos níveis plasmáticos de leptina associados a uma maior massa de tecido adiposo. Além disso, observou-se, no tecido adiposo epididimal, uma expressão gênica aumentada de angiotensinogênio e TGF- β e diminuição do receptor Glut4; além de ausência de hipertrofia. A expressão de TNF- α não está alterada, bem como a ingestão alimentar, os níveis séricos de adiponectina e o peso corpóreo.

A análise da relação do peso do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal mostrou que os animais KO Mas possuem um considerável aumento da massa adiposa (em média 63%) em relação ao seu controle WT FVB/N, apesar de não possuir diferença no peso corporal. Normalmente o aumento da massa adiposa em um mamífero leva ao aumento do peso corporal. Dessa forma, uma possibilidade para justificar o dado encontrado seria de que o animal KO Mas

possui, em algum(s) outro(s) tecido(s), perda de massa ou atrofia, como consequência da ausência do receptor Mas.

A análise histológica do tecido adiposo foi feita para averiguar se o aumento da massa adiposa deve-se a um processo hipertrófico, hiperplásico ou ambos. Verificou-se que não existe diferença no diâmetro dos adipócitos e nem uma diminuição do número de adipócitos por campo nos animais KO Mas. Dessa forma, concluímos que o aumento da massa adiposa se deve a uma hiperplasia tecidual e não a uma hipertrofia. Esse dado é corroborado pelo aumento da expressão de TGF- β no tecido adiposo, uma citocina que estimula a proliferação tecidual e a formação de colágeno (Zhang R, 2006).

Outro dado interessante foi a ausência de alteração na ingestão de ração, indicando que nesse modelo o aumento da massa adiposa se deve a alterações metabólicas e não a mudança no comportamento alimentar.

Em nosso estudo constatamos que os camundongos KO Mas, já com dez semanas, apresentam aumento dos níveis de triglicérides, colesterol total, resistência a insulina e intolerância a glicose. A RI é o fator mais comum no quadro de síndrome metabólica. Estudos recentes ligaram a resistência à insulina à outros fatores de risco coronários, incluindo a formação de lipoproteína de baixa densidade (LDL); altos níveis de gordura no sangue após as refeições; altos níveis de ácido úrico, e altos níveis de plasminogênio, que diminui a capacidade do organismo de diluir possíveis coágulos sanguíneos. (Shoelson SE. *et. al.*, 2006; Cassis LA, 2000)

As associações epidemiológicas entre inflamação, diabetes do tipo 2 e obesidade já vêm de longa data, porém estudos epidemiológicos recentes ampliaram esse conhecimento e foram encontrados vários marcadores de processos inflamatórios associados com a resistência à insulina. Estudos atuais

mostram que o tecido adiposo produz várias citocinas, como o TNF- α , que causa resistência à insulina em modelos experimentais e têm papel fundamental na patogênese da resistência à insulina. (Shoelson SE. *et. al.*, 2006)

Sabe-se que a ausência do TNF- α ou de seus receptores resulta em melhora significativa da sensibilidade à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta, hipotalâmica ou genética (Ventre *et. al.*, 1997; Uysal *et. al.*, 1994). Assim, a ausência de alteração nos níveis dessa citocina, encontrado em nosso estudo, sugerem que pelo menos no tecido adiposo alterações no TNF- α não participam do mecanismo de resistência a insulina, que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diminuição do receptor Glut4 no tecido adiposo dos animais knockout .

Estudos mostram que a célula adiposa é uma das poucas células que dispõem de todo o maquinário necessário para a síntese de angiotensina II localmente. Estudos utilizando cultura de células adiposas mostraram que o angiotensinogênio (AGT) e a Ang II participam da regulação e diferenciação do fenótipo do adipócito (Cassis LA *et. al.*, 1998b). As implicações da angiotensina na gênese da hipertensão do obeso começam a se tornar cada vez mais óbvias. Em cultura de células adiposas, a angiotensina II é fator adipogênico, enquanto no animal vivo atua como importante redutor do peso e da massa adiposa. É provável que a angiotensina II derivada do tecido adiposo exerça um papel chave na modulação do metabolismo lipídico e atue também como elo entre obesidade e hipertensão (Cassis LA., 2000). Além disso, a hipótese de que uma maior expressão do gene do angiotensinogênio em obesos contribua para os mecanismos perpetuantes do excesso de peso é bastante atraente, necessitando de pesquisas adicionais sobre variação da ação tecidual da Ang II para sua validação.

O aumento da expressão de AGT e sua secreção é uma importante característica da diferenciação do adipócito, principalmente devido ao papel fundamental da Ang II na maturação do pré-adipócito. Acredita-se que a Ang II controle a adiposidade pela regulação da síntese e armazenamento de lipídeos, aumentando o conteúdo de triglicérides e alterando a atividade de enzimas lipogênicas (sintase de ácidos graxos e glicerol-3-fosfato desidrogenase) (Strazzullo *et. al.* 2004). Assim a Ang II pode estimular a maturação adipocitária, enquanto, paralelamente, aumenta a degradação lipídica.

Vários estudos têm demonstrando que na obesidade ocorre aumento da expressão de AGT (Giacchetti *et. al.* 2002; Rankinen *et. al.* 1999). Adipócitos de ratos obesos Zucker, por exemplo, possuem maior expressão e secreção de AGT (Hainault *et. al.* 2002). Esses resultados corroboram os dados obtidos para a expressão de AGT no tecido adiposo epididimal dos camundongos KO Mas, que está aumentada. No tecido adiposo e no fígado de ratos SD a glicose possui efeito estimulante e a insulina inibidor, da expressão de AGT (Gabriely *et. al.* 2001). Em ratos obesos o efeito de estímulos nutricionais está aumentado devido ao quadro de resistência a insulina que gera supressão do efeito da mesma. (Jones *et. al.* 1997). Esse mesmo efeito pode ser observado no animal KO Mas, visto que ele apresenta resistência à insulina e intolerância a glicose com aumento da glicemia de jejum. Assim a menor ação da insulina e o aumento da glicose podem contribuir para o aumento da expressão de AGT.

A estimulação da expressão de AGT no tecido adiposo em camundongos com maior massa adiposa, como o KO Mas, pode ser uma das explicações para a maior pressão arterial nesses animais (Todoras *et. al.*, 2006; Moura, 2007). No caso do animal KO Mas sabemos que esse efeito deve estar também associado

à ausência do efeito vasodilatador do eixo Ang-(1-7)/Mas. (Brosnihan K.B. *et.al.*, 1998).

Os estudos que mostram a correlação do SRA com o peso corporal são controversos e as vezes inconclusivos, indicando a participação da Ang II, algumas vezes como adipogênica e outras como adipolítica (Katsuya *et. al.* 1995; Veda *et. al.* 1995; Nagi *et. al.* 1998; Jones *et. al.* 1997b). Sabendo-se que o tratamento com os inibidores de ECA diminui a produção de Ang II e leva ao aumento dos níveis de Ang-(1-7), e que os efeitos da Ang II podem ser contrapostos pela Ang-(1-7), podemos supor que parte dos efeitos dos iECA se deva a Ang-(1-7) (UK 1984; McGrath *et. al.* 1990; Campbell *et. al.* 1995). Os dados do nosso estudo sugerem um papel do eixo Ang-(1-7)/Mas no controle da massa gorda e podem explicar a perda de peso que ocorre após a administração de iECA, tanto em roedores quanto em humanos. Benter e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com Ang-(1-7) ou com seu análogo não peptídico AVE-0991, gerou melhora significativa no quadro de proteinúria, nos danos vasculares e na função cardíaca, indicando um papel protetor desse peptídeo nas patologias associadas ao quadro de diabetes. Porém não foram encontradas evidências de que o tratamento melhore o metabolismo glicídico. No entanto, o modelo utilizado (tratamento com streptozotocina) não permite uma análise adequada dos possíveis efeitos metabólicos da Ang-(1-7), considerando que o defeito primário é a lesão de células β pancreáticas, com conseqüente hipoinsulinemia, e não a resistência à insulina, como ocorre no diabetes tipo 2 e em nosso modelo experimental. Por outro lado, Nogueira e colaboradores (2007) observaram que mulheres grávidas com diabetes gestacional apresentam níveis circulantes diminuídos de Ang-(1-7),

reforçando a idéia de que o eixo Ang-(1-7)/Mas possa estar envolvido de forma importante nos mecanismos de controle do metabolismo.

Velloso *et. al.* 1996 documentaram que a Ang II diminui a fosforilação da tirosina insulina-estimulada aumentando a fosforilação da serina do receptor IRS-I de insulina. Esse processo diminui a sinalização intracelular da insulina diminuindo sua atividade (Folli *et. al.* 1999). Essa maquinaria alterada correlaciona o aumento dos níveis de AGT e Ang II com o quadro de resistência a insulina. Em indivíduos sadios a perfusão subcutânea do tecido adiposo com Ang II por microdiálise leva a inibição da captação de glicose (Boschmann *et. al.* 2001). Em nosso estudo observamos que a deleção genética do Mas em camundongos FVB/N produziu resistência a insulina e intolerância a glicose. Como já mencionado, um dos fatores envolvidos nessas alterações é a redução do Glut4. Nossos achados estão de acordo com o conceito de que, na maioria das vezes, a Ang-(1-7) exerce um papel contraregulatório aos efeitos da Ang II. Assim, podemos esperar que a abolição da ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas nos camundongos KO Mas possa ser a responsável pelo quadro de maior resistência a insulina, intolerância à glicose e aumento da glicemia de jejum. Isso provavelmente se deve a exarcebação do efeito inibidor da Ang II nas ações da insulina ou mesmo devido à abolição de um efeito direto da Ang-(1-7), mediado pelo receptor Mas, gerando um desequilíbrio dentro do SRA.

Em pacientes tratados com iECA e bloqueadores AT₁, ocorre um aumento significativo da sensibilidade insulínica e restauração dos níveis de adiponectina (Galletti *et. al.* 1999; Furuhashi *et. al.* 2003). Acredita-se que os bloqueadores do SRA possam remover a inibição exercida pela Ang II, promovendo assim um aumento dos níveis de adiponectina com aumento da sensibilidade insulínica (Janke *et. al.* 2002). Em nosso modelo a análise da razão da massa adiposa

pelos níveis de adiponectina sugere uma redução na função de cada adipócito em produzir esse hormônio, corroborando os dados da literatura que mostram perda na produção de adiponectina associado ao aumento da massa gorda. Os níveis totais só não estão menores no KO Mas devido ao aumento da massa do tecido adiposo.

Resultados de estudo recente (Shorr U. et. al., 1998), em que se avaliou a relação entre angiotensinogênio, leptina e níveis de pressão arterial em um grupo de jovens normotensos, evidenciaram que o substrato da renina se correlacionou significativamente com o índice de massa corporal, níveis plasmáticos de leptina e pressão arterial, nos indivíduos com história familiar positiva para hipertensão arterial. Concluiu-se que os níveis circulantes de angiotensinogênio contribuíram para a relação entre peso corporal e pressão arterial (Shorr U. et. al., 1998). Estudos mostram que a produção hormonal do tecido adiposo está bastante alterada em indivíduos obesos, ocorrendo aumento da produção de leptina e diminuição dos níveis de adiponectina (Weyer *et. al.* 2001). Uma vez que em pacientes que fazem uso de iECA os níveis de adiponectina são restabelecidos, acredita-se que o aumento nos níveis de Ang II seja importante na inibição da síntese de adiponectina, assim como ela é fundamental na maturação de pré-adipócitos (Furuhashi *et. al.* 2003). Dessa forma, a abolição do Mas pode ser responsável também pela menor síntese de adiponectina nos animais KO Mas, por potencializar o efeito da Ang II devido a ausência da ação contraregulatória da Ang-(1-7), ou mesmo pela ausência de uma via direta que poderia desencadear uma cascata de sinalização pela ativação do receptor Mas.

Segundo Prasad (2004), se tomarmos os níveis de leptina plasmática como indicador de massa do tecido adiposo, podemos explicar a contribuição

deste tecido para o aumento dos níveis de AGT. Essa relação foi confirmada nos animais KO Mas e WT FVB/N, visto que aumento da massa adiposa está intimamente correlacionado com o aumento nos níveis de leptina. Observamos que no knockout os níveis de leptina corrigidos pelo peso corporal são semelhantes ao do WT FVB/N, indicando que a produção de leptina individual de cada adipócito está normal, justificando assim o aumento nos níveis séricos acompanhando o aumento da massa gorda.

7- Conclusão

Resultados recentes do nosso laboratório mostram que o camundongo *Knockout* Mas da linhagem FVB/N possui pressão arterial elevada, disfunção endotelial (Todoras et. al, 2006) e microalbuminúria (Velloso *et.al.*,1996). Esse quadro, associado à dislipidemia, intolerância à glicose, resistência à insulina, e aumento da massa adiposa, observadas no presente estudo, caracteriza esse animal como um modelo de síndrome metabólica. Nossos dados sugerem que o eixo Angiotensina-(1-7)/Mas possui um importante papel no controle do metabolismo glicêmico e lipídico dos camundongos da linhagem FVB/N.

8- Referências Bibliográficas

Allain. C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W.; Fu, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, v.20, n.4:470-475, 1974.

Alenina, N; Bader, M; Walther, T. Imprinting of murine *Mas* Protooncogene is retracted to its antisense RNA. *Biochem and Biophys Res Comm.* 290:1072 – 1078, 2002.

Ambroz, C; Clark, AJL; Catt, KJ. The *Mas* oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochem. Biophys Acta.*1133:107 – 111, 1991.

Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 109: 2296-2301, 2004.

Bayorh, MA; Eatman, D; Walton, M; Socci, RR; Thierry-Palmer, M; Emmett, N. A-779 attenuates angiotensin-(1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats. *Peptides.* 23(1):57-64, 2002.

Bédard S, Marcotte B, Marette A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325: 487-493, 1997.

Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(1):H666-672, 2007.

Blaj S, Stanciu S, Jurcut C, Ciobica L.; Hypertension in obese patients: a dysmetabolic hypertension with a possible adipocyte dysfunction mechanism. *Rom J Intern Med.*; 41(2):103-11, 2003.

Boschmann M, Ringel J, Klaus S, Sharma AM. Metabolic and hemodynamic response of adipose tissue to angiotensin II. *Obes Res.* 9:486–491, 2001.

Braissant O, Foufelle F, Seotto C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator – activated receptors (PPARS): tissue distribution of PPAR – alpha, -beta, - gamma in the adult rat. *Endocrinology*; 137: 354-366, 1996.

Brosnihan, KB; Li, P; Ferrario, CM. Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 27:523 – 528, 1996.

Brosnihan, KB; Li, P; Tallant, EA; Ferrario, CM. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol. Res.* 31:227 – 234, 1998.

Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, et al. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 10:974–984, 1996.

Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 263(1 Pt 2):R89-94, 1992.

Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. Converting enzyme inhibition and its withdrawal in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 26:426-436, 1995.

Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45:1455-1462, 1996.

Cassis LA. Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation. *Am J Physiol*; 265: E860-E865, 1993.

Cassis LA, Fettinger M, Shenoy U. Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. *Cell Mol Asp of Angio Res*; 5: 39-47, 1996.

Cassis LA, Langher A, Fettinger M, et al. Cold exposure regulates renin-angiotensin system. *J Pharmacol Exp Ther*, 286(suppl 2): 718-26, 1998.

Cassis LA, Marchall DE, Fettinger MJ, et al. Mechanism contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol* ; 274: E867-E876, 1998b.

Cassis LA. Fat cell metabolism: Insulin, fatty acids, and renin. *Current Hypertens Rep*; 2: 132-138, 2000.

Claire M. Steppan, Shannon T. Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J. Brown, Ronadip R. Banerjee, Christopher M. Wright, Hiralben R. Patel, Rexford S. Ahima & Mitchell A. Lazar. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307- 312, 2001.

Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type I receptor in vascular smooth cells. *Hypertension* 37: 1141-1146, 2001.

Considine RV, Caro JF. Leptin: genes, concepts and clinical perspective. *Horm Res*. 46(6):249-56, 1996.

Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2(3):165-80, 2002.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Koziaradzki I, Scanga SE, Oliveiras-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417: 822-828, 2002.

Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdos EG. N-domain specific substrate and C- domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. *Hypertension* 31: 912-917, 1998.

Donoghue, M; Hsieh, F; Baronas, E; Godbout, K; Gosselin, M; Staglio, N; Donovan, M; Hsieh, F; Woolf, B; Robinson, K; Jeyaseelan, R; Breitbart, RE; Acton, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ. Res.*87:E1 – E9, 2000.

Engeli S, Negrel Raymond, Sharma A. Physiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-1277, 2000.

Engeli S, Schiling G P, Gorzeliniak K, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Intern Jf Biochem & Cell Biol* 35 :807-25, 2003.

Fazio, S., Babaev, V.R., Murray, A.B., Hasty, A.H., Carter, K.J., Gleaves, L.A., Atkinson, J.B.; Linton, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.9:4647-4652, 1997.

Fernandes, L; Fortes, ZB; Nigro, D; Tostes, RCA.; Santos, RAS.; Carvalho, MHC. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studies in vivo. *Hypertension*.37 (Part 2):703 – 709, 2001.

Ferrario, CM; Barnes, KL; Block, CH; Brosnihan, KB; Diz, DI; Khosla, MC; Santos, RAS. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*.15 (suppl I):I-13 – I-19, 1990.

Ferreira, AJ; Santos, RAS; Almeida, AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 38:665 – 668, 2001.

Ferrario, CM; Chappell, MC; Tallant, EA; Brosnihan, KB; Diz, DI. Counter-regulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 27:523 – 528, 1997.

Folli F, Saad MJ, Velloso L, et al. Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems. *Exp Clin Encrocrinol Diabetes* 107:133–139, 1999.

Fontes, MAP; Silva, LCS; Campagnole-Santos, MJ; Khosla, MC; Guertzenstein, PG; Santos, RAS. Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res*. 665:175-180, 1994.

Fossati, P.; Prencipe, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, v.28, 10:2077-2080, 1982.

Freeman, EJ; Chisolm, GM; Ferrario, CM; Tallant, EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 28(1):104–8, 1996.

Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain B.E., Lodish H.F. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte

complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2005–2010, 2001.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC; Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 10; 399(6736):597-601, 1999.

Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, et al. Blockade of the renin–angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 42:76–81, 2003.

Gabriely I, Yang XM, Cases JA, et al. Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. *Am J Physiol.* 281:R795–R802, 2001.

Galletti F, Strazzullo P, Capaldo B, et al. Controlled study of the effect of angiotensin converting enzyme inhibition versus calcium-entry blockade on insulin sensitivity in overweight hypertensive patients: Trandolapril Italian Study (TRIS). *J Hypertens.* 17:439–445, 1999.

Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, et al. Overexpression of the renin–angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens.* 15:381–388, 2002.

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

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular resistance. *J Clin Invest* 106: 453-458, 2000.

Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse, *Diabetes Metab.* 30: 13–19, 2004.

Gorelik, G; Carbini, LA; Scicli, AG. Angiotensin-(1–7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy.* 286: 403–410, 1998.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 13; 110(2):227-39, 2004.

Hainault I, Nebout G, Turban S, et al. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E59–E66, 2002.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*; 269:543-546, 1995.

Handa, RK; Ferrario, CM; Strandhoy, JW. Renal actions of angiotensin-(1-7) in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol.* 270:F141-F147, 1996.

Handa RK, Handa SE, Elgemark MK. Autoradiographic analysis and regulation of angiotensin receptor subtypes AT (4), AT (1) and AT (1-7) in the kidney. *Am. J. Physiol.* 281: F936-F947, 2001.

Harp J.B., DiGirolamo M. Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue : changes with maturation and adipose mass enlargement. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: B270-276,1995.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, et al. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 51:1699–1707, 2002.

Jaspard, E; Wei, L; Alhenc-Gélas, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II): studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem.* 268: 9498–9503, 1993.

Jones BH, Standridge MK, Taylor JW, Moustaid N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue, analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol.* 273:R36–R42, 1997a.

Jones BH, Standridge MK, Mousiad N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138:1512–1519, 1997b.

Katsuya T, Horiuchi M, Chen Y, et al. Relations between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulinresistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*15:779–782, 1995.

Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Lee Y, Shimabukuro M, Newgard CB, et al. Beta-cell function in normal rats made chronically hyperleptinemic by adenovirus-leptin gene therapy. *Diabetes* 46:1276-80, 1997.

Kucharewicz, I; Chabielska, E; Pawlak, R; Matys, T; Rolkowski, R; Buczko, W. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) closely resembles that of losartan. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*1 (3):268-272, 2000.

Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antitrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 40 (5):774-9, 2002.

Le Tran, Y & Foster, C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*30:676 – 678, 1997.

Lee K, Villena JA, Moon YS, Kim KH, Lee S, Kang C, Sul HS. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *The Jour. Clin. Invest.* 111:453-461, 2003.

Lemos VS, Cortes SF, Silva DM, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of the phenylephrine-induced contraction in the aorta mREN-2 transgenic rats. *Br. J Pharmacol* 135(7):1743-8, 2002.

Lyon C.J., Law R.E., Hsueh W.A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis, *Endocrinology* 144: 2195–2200, 2003.

Machado, RD; Ferreira, MA; Belo, AV; Santos, RA; Andrade SP. Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature. *Regul Pept.* 15;107(1-3):105-113, 2002.

Marrero MB, Fulton D, Stepp D, Stern DM. Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2009-2013, 2004.

Massiera F, Seydoux J, Geloën A, et al Angiotensin-deficient mice exhibit impairment of diet induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* 142: 5220-5225, 2001.

McGrath BP, Matthews PG, Louis W, et al. Double-blind study of dilevalol and captopril, both in combination with hydrochlorothiazide, in patients with moderate to severe hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 16:831– 838, 1990.

Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, et al. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J.* 149:33-45, 2005.

Moura M.M. Reflexos Cardiovasculares em Camundongos com alteração da expressão do receptor de angiotensina-(1-7), Mas. Tese de doutorado, Departamento de fisiologia e biofísica, UFMG, 2007.

Nagi DK, Foy CA, Mohamed-Ali V, et al. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism, plasma ACE levels, and their association with the metabolic syndrome and electrocardiographic coronary artery disease in Pima Indians. *Metabolism* 47:622–626, 1998.

Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor 1 antigen. *Kidney Int.* 50: 1897-1903, 1996.

Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* 109: 1417-1427, 2002.

Nogueira AI, Souza Santos RA, Simoes E Silva AC, Cabral AC, Vieira RL, Drumond C, Machado LJ, Freire CM, Ribeiro-Oliveira A Jr. The pregnancy-induced increase of plasma angiotensin-(1-7) is blunted in gestational diabetes. *Regul Pept.* 4, 2007.

Okamoto Y., Kihara S., Ouchi N., Nishida M., Arita Y., Kumada M., Ohashi K., Sakai N., Shimomura I., Kobayashi H., Terasaka N., Inaba T., Funahashi T., Matsuzawa Y., Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Circulation* 106: 2767–2770, 2002.

Osei, SY; Ahima, RS; Minkes, RK; Weaver, JP; Khosla, MC; Kadowitz, PJ. Differential responses to angiotensin-(1–7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol.* 234:35–42, 1993.

Paula, RD; Lima, CV; Khosla, MC; Santos, RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension.*26:1154-1159, 1995.

Porsti, I; Bara, AT; Busse, R; Hecker, M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1–7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol* 111:652–654, 1994.

Prasad A, Quyyumi A. Renin- angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation* 110:1507-1512, 2004.

Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol* 46(4):459-463, 2005.

Ren, Y; Garvin, JL; Carretero, OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension.* 39:799, 2002.

Rankinen T, Gagnon J, Perusse L, et al. Body fat, resting and exercise blood pressure and the angiotensinogen M235T polymorphism: the heritage family study. *Obes Res* 7:423–430, 1999.

Roks, AJ; van-Geel, PP; Pinto, YM; Buikema, H; Henning, RH; deZeeuw, D; van-Gilst, WH. Angiotensin-(1–7) is a modulator of the human renin–angiotensin system. *Hypertension.* 34:296 – 301, 1999.

Rothenbacher D, Brenner H, Marz W, Koenig W. Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers. *European Heart Journal* 26:1640-6, 2005.

Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem J* 322: 235-239, 1997.

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA, The expression of TNF- α by human muscle. Relation to insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 1111-1116, 1996.

Sampaio WO, Nascimento, AA; Santos, RAS. Systemic and regional hemodynamics effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284(6):H1985-H1994, 2003.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007; 49(1):185-92

Sánchez M. B. Genes y Obesidad. *An. Esp. Pediátrico*, v.46, p.01-02, 1997.

Santos, RAS; Simões e Silva, AC; Magaldi, AJ; Khosla, MC; Cesar, KR; Passaglio, KT; Baracho, NCV. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*.27:875 – 884, 1996.

Santos, RAS; Campagnole-Santos, MJ; Andrade, SP. Angiotensin-(1-7) an update. *Regul Pept*. 91:45 – 62, 2000.

Santos, RA; Siomões e Silva, AC; Maric, C; Silva, DM; Machado, RP; De Buhr, I; Heringer-Walther, S; Pinheiro, SV; Lopes, MT; Bader, M; Mendes, EP; Lemos, VS; Campagnole-Santos, MJ; Schultheiss, HP; Speth, R; Walther, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(14):8258-8263, 2003.

Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14(8): 1019-1031, 2005.

Schiffrin EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *AJH* 15: 115S-122-S, 2002; Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, et al. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance *Hypertension* 43:255-262, 2004.

Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Trieu F, Lee Y, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:4637-4641, 1997.

Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, et al. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 43:255-262, 2004.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 116(7):1793-1801, 2006.

Shorr U, Blaschke K, Distler TS, Sharma AM. Relationship between angiotensin, leptin and blood pressure in young normotensive men. *J Hypertens*; 16:1475-1480, 1998.

Silva, LCS; Fontes, MAP; Campagnole-Santos, MJ; Khosla, MC; Campos, RRJr; Guertzenstein, PG; Santos, RAS. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of ventrolateral medulla. *Brain Res*. 613:321 – 325, 1993.

Singh B.M., Mehta J.L. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia. *Arch. Intern. Med*. 163: 1296-1304, 2003.

Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389, 1996.

Strazzullo P. and Galletti F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism *Current Opin Neph. and Hyper*. 13:325–332, 2004,

Tallant, EA; Lu, x; Weiss, RB; Chappell, MC; Ferrario, CM. Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor. *Hypertension*. 29(Part 2):388-393, 1997.

Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. Oct;42(4):574-9, 2003.

Tallant, EA; Ferrario, CM; Gallagher, PE. Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Cardiac Myocytes Through Activation of the Mas Receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(4):H1560-1566, 2005.

Tom, B; Vries, R; Saxena, PR; Jan Danser, AH. Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade. *Hypertension*. 38:95-99, 2001.

Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*.(9-10):1302-14, 2005.

Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 40:1371-1379, 1997.

(UK) Enalapril in Hypertension Study Group. Enalapril in essential hypertension: a comparative study with propranolol. *Br J Clin Pharmacol*,18:51–56, 1984.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 389: 610-4, 1994.

Veda S, Elliott HL, Morton JJ, Connell JM. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 25:1266–1269, 1995.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, et al. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12490– 12495, 1996.

Ventre J, Doebber T, Wu M, et al. Targeted disruption of the tumor necrosis factor α gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 46: 1526-1531, 1997.

Vickers, C; Hales, P; Kaushik, V; Dick, L; Gavin, J; Tang, J; Godbout, K; Parsons, T; Baronas, E; Hsieh, F; Acton, S; Patane, M; Nichols, A; Tummino, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidases. *J Biol Chem.*;277(17):14838-14843, 2002.

Von Bohlen und Halbach, O; Walther, T; Bader, M; Albrecht, D. Interaction between *Mas* and angiotensin AT₁ receptor in the amygdala. *J. Neurophysiol.* 83:2012 – 2019, 2000.

Walther, T; Balschun, D; Voigt, JP; Fink, H; Zuschratter, W; Birchmeier, C; Ganten, D; Bader, M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the *Mas* protooncogene. *The Journal of Biological Chemistry.* 273:11867 – 11873, 1998.

Walther, T; Voigt, JP; Fink, H; Bader, M. Sex specific behavioral alterations in *Mas*-deficient mice. *Behavioral Brain Research.* 107:105 – 109, 2000.

Walther, T; Wessel, N; Kang, N; Sander, A; Tschöpe, C; Malberg, H; Bader, M; Voss, A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the *Mas* protooncogene. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 33:1 – 9, 2000b.

Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension.* 45(2):163-9, 2005; Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.*44(3):248-52, 2004.

Welches, WR; Santos, RA; Chappell, MC; Brosnihan, KB; Greene, LJ; Ferrario, CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens.* 9(7):631 – 638, 1991.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1930–1935, 2001.

Yamada, K; Iyer, SN; Chappell, MC; Ganten, D; Ferrario, CM. Converting enzyme determines the plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 98:496 – 502, 1998.

Yamamoto, K; Chappell, K; Brosnihan, KB; Ferrario, CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC3, 4, 24, 11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 19:883 – 891, 1992.

Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., Yamashita S., Noda M., Kita S., Ueki K., Eto K., Akanuma Y., Froguel P., Foufelle F., Ferre P., Carling D., Kimura S., Nagai R., Kahn B.B., Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat. Med.* 8 :1288–1295, 2002.

Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N.H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature* 423: 762– 769, 2003.

Yoshimoto T, Naruse M, Shizume H, et al. Vasculo-protective effects of insulin sensitizing agent pioglitazone in neointimal thickening and hyperetensive vascular hypertrophy. *Atherosclerosis* 145: 333-40, 1999.

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

Zhang R, Ruan D, Zhang C. Effects of TGF-beta1 and IGF-1 on proliferation of human nucleus pulposus cells in medium with different serum concentrations. *J Orthop Surg.* 26;1:9, 2006.

Zhong Jian Cheng, Heikki Vapaatalo, Eero Mervaala. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med. Sci. Monit* 11(6): RA194-205, 2005.