

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Influência do Receptor B1 de Cininas na Fisiopatologia da Obesidade e do  
Diabetes *Mellitus* em Camundongos *ob/ob***

**Renata Zanella**

Pelotas, 2016

**Renata Zanella**

**Influência do Receptor B1 de Cininas na Fisiopatologia da Obesidade e do  
Diabetes *Mellitus* em Camundongos *ob/ob***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Carlos C. Barros

Co-Orientador: Augusto Schneider

Pelotas, 2016

Renata Zanella

Influência do Receptor B1 de Cininas na Fisiopatologia da Obesidade e do  
Diabetes *Mellitus* em Camundongos *ob/ob*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de agosto de 2016.

Banca Examinadora:

.....  
Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros

Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes.

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Torma Botelho

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Pieniz

Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Salete, pelo amor, esforço e dedicação que me possibilitaram chegar até aqui. E aos meus sobrinhos Elias, Luiz Antonio e Vitor que foram a minha alegria nesse período.*

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros e Prof. Dr. Augusto Schneider, pelas oportunidades, pela orientação e por acreditarem no meu trabalho.

Aos meus irmãos, Silvia, Dani, Elisa e Marco Antonio, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. E ao meu namorado, André pelo incentivo.

Aos meus amigos que tornaram tudo mais leve e agradável. A equipe do laboratório de Nutrifisiogenômica, em especial a Evelise Sampaio, Thaís Marten, Cássia Goulart, Itiane Jaskulski e Douglas Mesquita, que compartilharam comigo muitos momentos importantes. Agradeço pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos servidores do Departamento de Nutrição, em especial Renata Ramirez, por me ajudar com a manutenção dos animais.

A todos os professores da Faculdade de Nutrição e do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas pelo conhecimento que me passaram ao longo da minha formação e pela ajuda para realização deste estudo.

***“Os sábios reconhecem que a único modo de ajudar a si mesmo é  
ajudando os outros”.***

***(Elbert Hubbard)***

## Resumo

ZANELLA, Renata. **Influência do receptor B1 de cininas na fisiopatologia da obesidade e do diabetes *mellitus* tipo 2 em camundongos *ob/ob***. 2016. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O sistema calicreínas-cininas (SCC) está envolvido em diversos processos biológicos como modulação de dor, vasodilatação, permeabilidade vascular, edema e inflamação, tendo seus efeitos mediados por dois receptores específicos acoplados a proteína G, o receptor B1 e B2 de cininas. O SCC tem sido recentemente relacionado com a homeostase da glicose e resistência à insulina. O objetivo do presente estudo foi investigar a participação do receptor B1 (B1R) de cininas nos processos metabólicos relacionados à obesidade e ao diabetes mellitus tipo 2 em camundongos obesos. Para isso foram utilizados camundongos deficientes para a leptina e nocautes para o B1R de cininas (obB1). Quando comparados, os animais obB1 mostraram uma redução na ingestão alimentar em todo período avaliado (4° a 26° semana de vida); menor ganho de peso, tanto aos 3 meses (obWT,  $63,79 \pm 1,59$ ; obB1,  $51,22 \pm 1,09$  g,  $p < 0,001$ ) quanto aos 6 meses de idade (obWT,  $74,61 \pm 1,04$ ; obB1,  $57,98 \pm 1,58$  g,  $p < 0,001$ ); e menor depósito de gordura. No teste de tolerância a glicose, animais obB1 apresentaram maior captação de glicose do que seus controles quando jovens (obWT,  $46045 \pm 3492$ ; obB1,  $30875 \pm 2311$  (mg/dL).min,  $p < 0,01$ ). Adicionalmente, foi observado aumento do peso do fígado nestes animais, quando mais velhos (obWT,  $3,29 \pm 0,24$ ; obB1  $4,09 \pm 0,06$  g,  $p < 0,001$ ). Em conclusão, o silenciamento do gene do B1R oferece uma proteção contra a obesidade com um significativo impacto na homeostase da glicose. Estes resultados sugerem que o SCC pode ser um novo alvo para desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças metabólicas como obesidade e diabetes mellitus tipo 2.

**Palavras-chave:** bradicinina; des-Arg9-bradicinina; metabolismo; síndrome metabólica.

## Abstract

The kallikrein-kinin system (KKS) is involved in many biological processes such as modulating pain, vasodilation, vascular permeability, edema and inflammation, with effects mediated by two specific receptors coupled to G protein, B1 and B2 kinin receptor. The KKS has recently been associated with glucose homeostasis and insulin resistance. The aim of this study was to investigate the participation of B1 receptor (B1R) of kinins in the metabolic processes related to obesity and type 2 diabetes in obese mice. For this we used mice deficient for leptin and knockouts for B1R kinin (obB1). When compared, the animals obB1 showed a reduction in food intake in the whole study period (4 to 26 ° week of life); less weight gain, both at 3 months (obWT,  $63.79 \pm 1.59$ ; obB1,  $51.22 \pm 1.09$  g,  $p < 0.001$ ) and at 6 months of age (obWT,  $74.61 \pm 1.04$ ; obB1,  $57.98 \pm 1.58$  g,  $p < 0.001$ ); and less fat deposit. In the glucose tolerance test, obB1 animals had higher glucose uptake than their controls when young (obWT,  $46045 \pm 3492$ ; obB1,  $30875 \pm 2311$  (mg / dL) .min,  $p < 0.01$ ). Additionally, there was an increase in liver weight in these animals, while older (obWT,  $3.29 \pm 0.24$ ,  $4.09 \pm 0.06$  g obB1,  $p < 0.001$ ). In conclusion, the B1R gene silencing offers a protection against obesity have a significant impact on the glucose homeostasis. These results suggest that the KKS may be a new target for the development of new pharmacologic strategies for treating metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes mellitus.

**Key-words:** bradykinin; des-Arg9-bradykinin; metabolism; metabolic syndrome.



## Lista de figuras

Figura 1	Massa corpórea e ingestão alimentar.....	29
Figura 2	Teste de tolerância à glicose (TTG) de camundongos obB1 e seus controles obWT.....	30
Figura 3	Teste de tolerância à insulina (TTI) de camundongos obB1 e seus controles obWT.....	31
Figura 4	Desafio do piruvato em camundongos obB1 e obWT.....	32
Figura 5	Capacidade da glicemia de jejum em diferentes testes glicêmicos.....	33

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Massa de tecidos e órgãos.....	34
----------	--------------------------------	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	Associação Americana de Diabetes
AgRP	Proteína relacionada ao Agouti
B1R	Receptor B1 de cininas
B2R	Receptor B2 de cininas
BK	Bradicinina
CCK	Colecistoquinina
DCV	Doença cardiovascular
Des-Arg-BK	Des-Arg9-bradicinina
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
EPM	Erro padrão
HSL	Lipase hormônio sensível
IL6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
MS	Ministério da Saúde
NEFA	Ácido graxo livre não esterificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
POMC	Proopiomelanocortina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RI	Resistência à insulina
SCC	Sistema calicreína-cininas
SM	Síndrome metabólica
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAV	Tecido adiposo visceral
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## Sumário

1	Introdução	13
2	Objetivos	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	Revisão da Literatura	16
3.1	Obesidade	16
3.2	Leptina	19
3.3	Diabetes <i>mellitus</i>	20
3.4	Sistema calicreinas-cininas	21
4	Materiais e métodos	24
4.1	Modelos experimentais	24
4.2	Genotipagem	24
4.3	Desenho experimental	25
4.4	Controle de massa corporal e da ingestão alimentar	25
4.5	Glicemia de jejum	25
4.6	Teste de Tolerância à Glicose	26
4.7	Teste de Tolerância à Insulina	26
4.8	Desafio do Piruvato	26
4.9	Eutanásia dos Animais	26
4.10	Análise estatística	27
5	Resultados	28
6	Discussão	35
7	Conclusão	38
8	Referências bibliográficas	39

## 1- Introdução

O sistema caliceína-cinina (SCC) está presente em todo o organismo. Seu principal peptídeo efetor, a bradicinina (BK), tem duas origens: produzida pela ação da caliceína plasmática usando como substrato o cininogênio de alto peso molecular produzido pelo fígado (sistema circulante); pela ação da caliceína tecidual, tendo como substrato o cininogênio de baixo peso molecular produzido nos tecidos periféricos (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992). Inicialmente, relacionado à vasodilatação, inflamação, dor e edema, tem sido mostrado que o SCC também participa em diversos eventos fisiológicos e celulares, estando envolvido com a homeostasia da glicose (FONSECA et al., 2013), proteção ou injúria de tecidos e órgãos (ESTRELA et al., 2014) e sensibilidade à leptina (MORI et al., 2008). Seus efeitos são mediados por dois receptores de membrana acoplados a proteína G: o receptor B2 de cininas (B2R), o qual é constitutivo; e o receptor B1 de cininas (B1R), o qual tem sua expressão induzida por inflamação (DRAY & PERKINS, 1993; KISHI et al., 1998).

Estudos recentes mostram que a deficiência do B1R induziu anormalidades na homeostase de glicose e que o camundongo nocaute para este receptor é resistente à obesidade induzida por dieta hiperlipídica (MORI et al., 2008). Além disso, outros experimentos sugeriram importante ligação dos receptores de cininas com o controle do metabolismo energético e diferenciação de células adiposas (BARROS et al., 2012a; BARROS et al., 2012b). O modelo animal deficiente em leptina e para ambos os receptores B1 e B2 de cininas apresentaram aumento na glicemia dependente da idade, resistência à insulina, bem como alterações hepáticas (BARROS et al., 2012a).

A obesidade é um importante problema de saúde pública, pois predispõe o indivíduo a uma série de doenças, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (WHO). Nas últimas décadas, a redução de atividades físicas diárias e o aumento da disponibilidade de alimentos calóricos têm elevado as taxas de obesidade (CHOE et al., 2016). Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO) apontam que, em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos

no mundo estavam com sobrepeso, dos quais 600 milhões eram obesos. No Brasil, um levantamento do Ministério da Saúde revela que 52,5% da população adulta do país está acima do peso (VIGITEL, 2014). O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade está associada a muitas doenças crônicas, incluindo a diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hipertensão e certos tipos de câncer (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006).

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia persistente, devido ao aumento da resistência e produção insuficiente de insulina. Os mecanismos moleculares do DM2, associados a obesidade, parecem estar ligados a inflamação crônica de baixo grau, tanto em seres humanos como em modelos animais (KWON & PESSIN, 2013). Na obesidade, o aumento do tecido adiposo (TA), especialmente nas regiões centrais (visceral ou intra-abdominal) desenvolve um processo inflamatório, que por sua vez, leva a resistência à insulina (SEARS & PERRY, 2015). Essa inflamação associada à resistência insulínica local pode propagar-se de forma sistêmica comprometendo a ação da insulina em outros tecidos, predispondo ao desenvolvimento de doenças crônicas e comorbidades relacionadas com a obesidade (FALLOIA et al., 2012)

O TA é importante para o armazenamento e fornecimento de nutrientes e também produz proteínas chamadas adipocitocinas, como a leptina e adiponectina, que regulam o comportamento alimentar, além de outras adipocinas que modulam respostas inflamatórias (KWON & PESSIN, 2013). A leptina é um fator importante na gênese e manutenção da obesidade sendo um eficiente sinalizador nutricional para muitos outros sistemas fisiológicos (FRIEDMAN & HALAAS, 1998). Seus níveis circulantes estão ligados à quantidade de TA, presente no organismo, sendo anorexígena em nível central, além de ativar o gasto energético e a lipólise (BARROS et al., 2009). O camundongo deficiente para leptina (camundongo ob/ob) é uma importante ferramenta para estudos de obesidade por produzir uma leptina truncada e apresentar obesidade hereditária severa, diabetes *mellitus* com resistência à insulina, entre outras anormalidades associadas (BARROS et al., 2009).

Desta forma, buscou-se investigar a participação B1R nos processos de desenvolvimento das comorbidades relacionadas à obesidade e do DM2 em camundongos obesos deficientes para o B1R e para leptina.

## **2- Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi investigar a participação do receptor B1 de cininas nos processos metabólicos relacionados à obesidade, ao DM2 e correlações com o envelhecimento em animais deficientes para o gene da leptina.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito do B1R:

- no desenvolvimento corporal e na adiposidade de animais obesos;
- na ingestão alimentar de animais obesos;
- na massa de alguns órgãos e tecidos como coração, fígado e músculo esquelético em animais obesos;
- na homeostase glicêmica de animais obesos;
- nas alterações nos parâmetros citados acima relacionados com a idade e o envelhecimento de animais obesos.



### 3- Revisão da Literatura

#### 3.1- Obesidade

A WHO estima que 600 milhões de adultos no mundo estão obesos e cerca de 2 bilhões acima do peso. A forma mais comum de obesidade que afeta a população é de etiologia poligênica, resultante de um balanço energético positivo, em que o excesso de energia é armazenado no tecido adiposo e em longo prazo desenvolve a obesidade (FALOIA et al., 2012; WHO).

Nas últimas décadas, a redução de atividades físicas diárias e o aumento da disponibilidade de alimentos calóricos têm elevado as taxas de obesidade (CHOE et al., 2016). O equilíbrio entre consumo e gasto energético é influenciado por uma interação de fatores genéticos, ambientais e sociais (FALOIA et al., 2012). O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade está associado a muitas doenças crônicas relacionadas com a alimentação, incluindo a diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hipertensão e certos tipos de câncer (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006).

O índice de massa corporal (IMC) é comumente usado para classificar a média de sobrepeso e obesidade em nível populacional. É um índice simples calculado pelo peso (quilograma) dividido pelo quadrado da altura (metro), em que se considera o sobrepeso para IMC igual ou maior que 25 kg/m<sup>2</sup> e obesidade para IMC igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (WHO). O excesso de gordura definido pelo aumento do IMC tem sido reconhecido como um fator de risco para doenças metabólicas como doenças cardiovasculares (DCV) e DM2 (CASTRO et al., 2014).

A síndrome metabólica (SM) é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006). Indivíduos com SM têm três vezes mais propensão a ter um ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral em comparação com indivíduos sem a síndrome. A SM é definida pela presença de obesidade central (medida pela circunferência da cintura), mais dois dos seguintes fatores: triglicerídeos elevado, redução do HDL-colesterol, aumento da pressão sanguínea ou elevada glicose de jejum no plasma (IDF).

A resistência à insulina (RI) é caracterizada como uma disfunção metabólica na qual as células não respondem adequadamente à insulina circulante (SEARS & PERRY, 2015). No estado de RI, há uma diminuição de absorção de glicose pelo músculo e um aumento de produção endógena pelo fígado, resultando em hiperglicemia tanto em jejum quanto pós-prandial. (CASTRO et al., 2014). No entanto, não é somente a homeostase da glicose que é afetada pelo comprometimento da ação da insulina. Há um aumento da lipólise pelos adipócitos e uma redução na síntese de proteínas pelo músculo (CASTRO et al., 2014). A RI também está associada com a disfunção endotelial e microvascular, uma vez que são fatores importantes em distúrbios metabólicos como a hipertensão (FALOIA et al., 2012).

Embora a síndrome metabólica esteja associada com a obesidade abdominal, alterações lipolíticas, inflamação e resistência à insulina (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006), as diferenças entre os depósitos de tecido adiposo no que diz respeito a disfunção do adipócito, vascularização do tecido, grau e local de inflamação também determinam a correlação com o aumento do risco de desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares (FALOIA et al., 2012).

O tecido adiposo (TA), antes visto apenas como um órgão de armazenamento, atualmente, é reconhecido como um importante regulador da homeostase energética, devido as amplas funções metabólicas e endócrinas (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; GUNAWARDANA, 2014; CHOE et al., 2016). Uma característica relevante para suas funções é sua capacidade de expansão, que pode ser pelo aumento do tamanho de adipócitos (hipertrofia) ou pela adipogênese (hiperplasia) de adipócitos pré-existentes (CASTRO et al., 2014).

Com o aumento progressivo dos adipócitos, o TA atinge sua capacidade de expansão, que leva a uma redução do fornecimento de sangue para esse tecido e ocorrência de hipóxia (FALOIA et al., 2012; SEARS & PERRY, 2015). Nessa condição ocorre infiltração de macrófagos e necrose no tecido levando a produção de fatores pró-inflamatórios, tais como: interleucina-6 (IL6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; FALOIA et al., 2012).

Os adipócitos desenvolvem um processo inflamatório, que por sua vez leva a RI, deixando-os resistentes aos efeitos antilipolíticos da insulina pela

redução da atividade da lipase hormônio sensível (HSL), que resulta em um aumento do fluxo de ácidos graxos livre não-esterificados (NEFA), que começam a acumular-se em outros órgãos e tecidos não adiposos, tais como o fígado e o músculo esquelético (SEARS & PERRY, 2015). A lipotoxicidade causada por depósitos de gordura nesses órgãos associados com a RI local, compromete suas funções e predispõe ao desenvolvimento de doenças crônicas (SEARS & PERRY, 2015).

Essa inflamação, que pode se propagar de forma sistêmica, está associada com o desenvolvimento de comorbidades relacionadas com a obesidade (FALLOIA et al., 2012). Não apenas pelo excesso de gordura em si, mas sua distribuição no corpo, especialmente, nas regiões centrais (visceral ou intra-abdominal) que desempenham um importante papel na patogênese dessas doenças (CASTRO et al., 2014). Na obesidade visceral, níveis plasmáticos de proteína C reativa estão aumentados, sendo este um marcador inflamatório e indicativo de risco de infarto do miocárdio (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006).

Com base em sua morfologia e funcionalidade, o TA classifica-se em dois principais tipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) (CASTRO et al., 2014). O TAM é formado por gotículas lipídicas multiloculares, que em seres humanos estão localizadas em pequenos depósitos em regiões cervical-supraclaviculares (GUNAWARDANA, 2014). É altamente vascularizado e com um maior número de mitocôndrias, o que justifica o aspecto “marrom” (KWON & PESSIN, 2013; CHOE et al., 2016). O TAM é essencial para dissipar energia através da regulação da termogênese em resposta a ingestão de alimentos e ao frio (CHOE et al., 2016). O TAB se distribui por todo corpo e representa uma grande reserva de energia. Os adipócitos do TAB são compostos por grandes gotas de gordura uniloculares (GUNAWARDANA, 2014).

Anatomicamente, o TAB compreende dois principais depósitos, subcutâneo e o visceral (KWON & PESSIN, 2013). O tecido adiposo visceral (TAV) concentra-se na cavidade abdominal, em torno de órgãos internos, tendo como suas funções fisiológicas fundamentais, o isolamento e armazenamento de energia. É subdividido em mesentérica, omental, perirenal e depósitos peritoneal (CHOE et al., 2016). Na obesidade, o excesso de TAV está

relacionado com complicações metabólicas, tais como: RI e DM2 (SEARS & PERRY, 2015). Depósitos na região omental e mesentérica são particularmente importantes na ligação direta com a veia portal, favorecendo a resistência insulina hepática e esteatose hepática (CHOE et al., 2016).

Como já descrito anteriormente, o TAB atua como um órgão endócrino, modulando processos fisiológicos e metabólicos. Vários hormônios, peptídeos e citocinas têm sido identificados e amplamente estudados com relação à homeostase energética, sendo denominadas adipocitocinas (CHOE et al., 2016). Dentre elas, as principais moléculas relacionadas com a homeostase metabólica são a adiponectina e a leptina (GUNAWARDANA, 2014).

A adiponectina é uma citocina oriunda do TA, cujos níveis aumentam com a perda de peso e estão reduzidos na presença de obesidade visceral. Enquanto a maioria das adipocinas mostram atividade pró-inflamatória, adiponectina parece proteger contra a inflamação crônica (DESPRÉS & LEMIEUX, 2006; FALLOIA et al., 2012). Sendo amplamente reconhecida por seus efeitos na sensibilidade à insulina em tecidos periféricos (GUNAWARDANA, 2014).

### **3.2 Leptina**

A leptina é uma proteína secretada pelos adipócitos, tem sua ação primária no núcleo hipotalâmico arqueado, no qual inicia uma cascata de eventos inibindo a ingestão de alimentos e promovendo o gasto de energia (FRIEDMAN, & HALAAS, 1998). Descoberta em 1994 por Zhang et al., a partir da identificação de uma mutação no gene *ob*, que levava ratos a um fenótipo de obesidade grave, desde então, a leptina continua sendo a adipocitocina mais estudada, contribuindo significativamente para a compreensão dos mecanismos endócrinos subjacentes à regulação do peso corporal (CHOE et al., 2016).

O armazenamento e a utilização de energia a partir de nutrientes constituem um sistema homeostático. A leptina faz parte desse sistema, assim como a temperatura corporal, concentração plasmática de glicose, aminoácidos, colecistoquinina (CCK) e outros hormônios, que também modulam padrões de fome e saciedade (FRIEDMAN & HALAAS, 1998).

A leptina atua sobre receptores de superfície de neurônios que expressam proteína relacionada ao Agouti (AgRP) no hipotálamo lateral e proopiomelanocortina (POMC) no hipotálamo medial, secretada em resposta a ingestão de alimentos, com função de inibir o apetite e estimular a saciedade (CHOE et al., 2016). Os níveis séricos de leptina estão correlacionados com a massa de TA, tanto em humanos como em roedores. São também influenciados por fatores nutricionais e hormonais, como alterações na insulinemia (JUNG & KIM, 2013). Também promove a oxidação lipídica e biogênese mitocondrial e acelera o gasto de energia em tecidos periféricos (CHOE et al., 2016).

Atualmente, tem sido demonstrado que a leptina tem um amplo espectro de ação em muitas áreas do sistema nervoso central e órgãos periféricos. Por exemplo, no fígado é considerada um dos principais hormônios reguladores do conteúdo de triglicerídeos hepáticos, assim como no músculo esquelético e no pâncreas e por inibição direta da formação de triglicerídeos e a estimulação da oxidação de ácidos graxos livres (MORI et al., 2008; FONSECA et al., 2013).

Apesar da forte participação da leptina no metabolismo energético, o uso terapêutico desse hormônio não teve êxito em indivíduos com obesidade crônica, devido à resistência a sua ação pelos níveis plasmáticos elevados (KWON & PESSIN, 2013). Portanto, sabe-se que a resistência à ação da leptina no hipotálamo inibe o controle do apetite e a oxidação lipídica, agravando a obesidade (CHOE et al., 2016). Mais recentemente, vários mecanismos de resistência à leptina na obesidade têm sido propostos. Os principais são a saturação do transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica e a inflamação crônica induzida pela obesidade (KWON & PESSIN, 2013).

Camundongos *ob/ob* exibem características como: diminuição da temperatura corporal, hiperfagia, diminuição do gasto energético, hiperglicemia, RI e DM, diminuição da função imunológica e infertilidade (FRIEDMAN & HALAAS, 1998). Sendo um importante modelo animal para estudos da obesidade e doenças relacionadas (BARROS et al., 2009). Embora esses animais tenham a função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal prejudicada, tornando-os inférteis, devido uma diminuição de hormônios reprodutivos, técnicas de transplante de TA têm se mostrado uma forma eficiente de restaurar

a fertilidade desses animais. Isto permite a geração de animais duplo nocaute e a geração de animais *ob/ob* com mutação adicional, além de reduzir o tempo e o custo que seriam necessários para a obtenção de grupos pelo método tradicional (BARROS et al., 2009).

### **3.3- Diabetes *mellitus***

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica que afeta cerca de 422 milhões de pessoas no mundo, sendo relatada como a causa de morte de 1,5 milhões de pessoas de forma direta em 2012 (WHO). Atualmente, o DM é caracterizado como um conjunto de distúrbios metabólicos que têm em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina em nível de célula  $\beta$  pancreática e na sensibilidade a esse hormônio em tecidos periféricos (GUNAWARDANA, 2014). A classificação atual do DM, segundo a OMS e a ADA, inclui quatro classes clínicas baseadas na etiologia da doença: o DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM.

O DM1 está associado à deficiência absoluta de insulina devido a destruição das células  $\beta$  pancreáticas, já o DM2 corresponde a deficiência funcional de insulina devido a progressão de resistência insulínica, sendo este o tipo mais prevalente (GUNAWARDANA, 2014). A intolerância à glicose com início ou diagnóstico durante a gestação é classificada como DM gestacional. E são incluídas na categoria de tipos específicos de DM, quando os defeitos ou processos causadores podem ser identificados, tais como: defeitos genéticos na função das células  $\beta$  pancreáticas ou na ação da insulina, doença do pâncreas exócrino, por medicamentos ou agentes químicos e infecções (GUNAWARDANA, 2014).

O DM2 é a forma mais prevalente, verificada em 90% a 95% dos casos (ADA, 2010). Embora a causa seja uma interação de fatores genéticos e ambientais, a maioria dos pacientes com este tipo de diabetes apresenta sobrepeso ou obesidade (WHO), a qual provoca uma condição de resistência à insulina (ADA, 2010).

A longo prazo a hiperglicemia crônica provocada pelo diabetes está associada com disfunções e danos em diversos órgãos: retinopatia, nefropatia levando à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de amputações. Pacientes acometidos pelo diabetes apresentam um aumento na incidência de doença cardiovascular aterosclerótica, artéria periférica e vascular cerebral (ADA, 2010).

### **3.4-Sistema calicreína-cinina**

Ao longo dos anos, estudos mostraram a participação do sistema calicreína-cinina (SCC) em diversos processos biológicos, incluindo a inflamação, nocicepção, permeabilidade vascular, regulação da pressão arterial, contração e relaxamento do músculo liso (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Estudos recentes têm mostrado a importância do SCC na homeostase da glicose, com alterações hepáticas importantes, que modulam a secreção de insulina (BARROS et al., 2012a).

O SCC é um complexo sistema, com vários peptídeos bioativos (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). A bradicinina (BK) e a Lys-bradicinina (Lys-BK) são resultantes da clivagem de cininogênios por enzimas chamadas calicreínas (BHOOLA et al., 1992; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). A BK pode ter duas origens distintas, uma produzida pela ação da calicreína plasmática (sistema circulante) que usa como substrato o cininogênio hepático de alto peso molecular, ou também pela ação da calicreína tecidual que tem como substrato o cininogênio de baixo peso molecular produzido nos tecidos periféricos (BHOOLA et al., 1992). As cininas também podem ser metabolizadas por carboxipeptidases, que clivam a arginina carboxi-terminal dando origem a des-arg9-bradicinina (DBK) e Lys-DBK de BK e Lys-BK (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

Tendo como principais peptídeos efetores a BK e a DBK, estas exercem seus efeitos através de dois receptores específicos acoplados a proteína G, denominados receptores B1 e B2 de cininas (B1R e B2R, respectivamente). O B2R é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos, enquanto o B1R é

regulado por estímulos inflamatórios (LEEB-LUNDBERG et al., 2005), o qual tem sua expressão induzida por várias citocinas pró-inflamatórias importantes (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e EGF), além do NFK $\beta$  que é o principal responsável pela regulação positiva deste receptor (DUCHENE & AHLUWALIA, 2009).

As cininas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo regulação da pressão sanguínea, homeostase do sódio e processos inflamatórios (CAMPBELL, 2000). Na homeostase energética, as cininas induzem a sensibilidade a insulina em adipócitos e controlam sua liberação pelas células pancreáticas (MORI et al., 2008). A BK aumenta a absorção de glicose no músculo e TA, enquanto o metabolito Des-Arg9-BK controla a sensibilidade da leptina no hipotálamo e liberação de insulina em ilhotas pancreáticas (ARAUJO et al., 2006). Na ausência do B2R em animais *ob/ob* houve um aumento da glicemia de jejum e uma redução da tolerância à glicose, resultando em um quadro de resistência à insulina (BARROS et al., 2012b).

Na deleção dos dois receptores foi demonstrado proteção contra obesidade induzida por dieta hiperlipídica e uma redução nos níveis séricos de leptina e insulina, dois importantes hormônios relacionados com a homeostase energética (MORAIS et al., 2015). Por muito tempo, os efeitos na homeostase da glicose foram atribuídos a ativação do B2R por ser constitutivamente expresso. Contudo, estudos recentes têm demonstrado o papel do receptor B1 em diversos processos metabólicos, e não somente em processos inflamatórios (MORI et al., 2012; FONSECA et al., 2013). A deficiência do B1R em animais é capaz de prevenir a obesidade induzida por dieta rica em gordura (MORI, et al., 2008; FONSECA, et al., 2013; MORAIS, et al., 2015), além de promover a sensibilidade a leptina centralmente (FONSECA, et al., 2013).

Claras evidências demonstram os efeitos benéficos da deleção do B1R em camundongos na fisiopatologia da obesidade, porém os mecanismos permanecem desconhecidos. Alguns estudos sugerem que esses efeitos poderiam estar envolvidos na modulação da sensibilidade à leptina, uma vez que animais deficientes para a leptina não se beneficiam da deleção do B1R (MORI et al., 2008).



## 4- Materiais e Métodos

### 4.1- Modelos Experimentais

Os animais deficientes para os genes da leptina e para o receptor B1 de cininas (Lepob.Bdkrb1<sup>tm</sup>/Lepob.Bdkrb1<sup>tm</sup>; a seguir chamados de obB1) foram gerados por meio de restauração da fertilidade dos animais deficientes para leptina (camundongos ob/ob, Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>, a seguir chamados de obWT) por meio de técnica de transplante de tecido adiposo (BARROS et al., 2009) e cruzamento com animais nocaute para o BDKB1R (Bdkrb1<sup>tm</sup>/Bdkrb1<sup>tm</sup>) gerados em colaboração com o instituto Max Delbrück Center of Molecular Medicine, Berlin – Alemanha, e cedidos para este projeto pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo, em colaboração multicêntrica.

Os animais e seus controles foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, em estantes ventiladas, com água e ração Nuvilab ® administrada *ad libitum*, em condições controladas de temperatura ( $20 \pm 2$  °C), umidade (40-70%) e fotoperíodo (12h claro/escuro). O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas, registro nº 3715. E todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com normas e cuidados estabelecidos pelo mesmo.

### 4.2- Genotipagem

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de uma biópsia (~ 0,3 cm) da extremidade da cauda dos camundongos. Para a digestão das amostras adicionaram-se 100 µL de EAR Buffer e 5 µL de proteinase K em cada amostra, as quais foram incubadas em banho seco de 55 °C por aproximadamente 24h. Após esse período, adicionaram-se 750 µL de tampão TE Buffer em cada tubo.

Para identificação do gene *ob*, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers específicos (sense) 5' TGA GTT TGT

CCA AGA TGG ACC 3', (antisense) 5' GCC ATC CAG GCT CTC TGG 3' e 5' GCA GAT GGA GGA GGT CTC A 3', conforme descrito por Ellet et al. (2009). Seguindo o protocolo de: 1 µL de DNA extraído, 7 µL GoTaq Master Mix (Promega), 2 µL do mix de primers (composto por 5 µL de cada, RFPL-R, RFLP-F, Lepob) e 3 µL de água milli-Q. Todas as amostras foram submetidas às seguintes condições: 95 °C, 2', 40 ciclos de 95 °C 30'', 58 °C 30'', 72 °C 45'', e 72 °C 7'. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% contendo SYBR® Safe DNA gel stain, e as bandas esperadas foram de 191 e 123 pb.

#### **4.3- Desenho Experimental**

Todas as análises foram realizadas no terceiro e no sexto mês de idade dos animais, a fim de registrar as alterações decorrentes do envelhecimento, visto que muitas morbididades estudadas são dependentes da idade dos indivíduos. Foram utilizados machos da linhagem C57BL/6 divididos em 4 grupos (6 animais por grupo), sendo um grupo controle e outro intervenção. Os grupos controle de 3 e 6 meses foram compostos por animais obWT, que são deficientes apenas para o gene da leptina (*ob/ob*), já os grupos intervenção, obB1, continham animais deficientes para o gene da leptina (*ob/ob*) e nocaute para o B1R.

#### **4.4- Controle de massa corporal e da ingestão alimentar**

A partir do desmame, foram separados três animais por caixa e todos receberam a ração padrão *ad libitum*. Para o controle de ingestão alimentar, o consumo de ração foi monitorado, semanalmente, e o consumo total por caixa foi dividido pelo número de animais, estimando a ingestão alimentar individual. Os animais também foram pesados, semanalmente, para determinar o desenvolvimento corporal.

#### **4.5- Glicemia de Jejum**

A glicemia de jejum foi mensurada aos 3 e aos 6 meses de idade, nos dois grupos, após períodos de jejum variados e com acesso a água *ad libitum*. Para realizar a medição foi utilizado o glicosímetro Accu-Chek Performa (ROCHE) e a uma gota de sangue da veia caudal dos animais.

#### **4.6- Teste de Tolerância à Glicose**

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado nos animais aos 3 e 6 meses de idade. Após jejum de 6 horas, com água *ad libitum*, sendo mensurada a glicemia basal e, posteriormente, administrada glicose anidra (Sigma) 1 mg/g de peso vivo, via intraperitoneal. A glicemia foi medida por meio de uma gota de sangue da veia caudal dos animais, nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após as injeções, com auxílio de glicosímetro comercial Accu-Chek Performa (ROCHE).

#### **4.7- Teste de Tolerância à Insulina**

Aos 3 e 6 meses de idade foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI) nos animais. Após jejum de 4 horas, com água *ad libitum*, foi mensurada a glicemia basal e, posteriormente, administrada insulina humana Humalog® (1 UI/Kg de peso vivo) via intraperitoneal. A glicemia foi medida por meio de uma gota de sangue da veia caudal dos animais, nos tempos 0, 5, 20 e 35 minutos após as injeções, com auxílio de glicosímetro comercial Accu-Chek Performa (ROCHE).

#### **4.8- Desafio com Piruvato**

O desafio com piruvato foi realizado para testar a capacidade da gliconeogênese, como indicativo de resistência à insulina no fígado. Aos 3 e 6 meses de idade, após jejum de 24 horas, o piruvato de sódio foi injetado via

intraperitoneal na dose de 1 g/kg de peso vivo e a glicemia medida nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após as injeções.

#### **4.9- Eutanásia dos Animais**

A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical, após 6 horas de jejum. Uma amostra de aproximadamente 1,5 mL sangue foi imediatamente coletada em tubos contendo solução EDTA. Em seguida, o coração, tecido adiposo epididimal, tecido adiposo perirrenal, músculo esquelético e fígado foram coletados e tiveram sua massa mensurada. Todos os órgãos e tecidos tiveram uma amostra imediatamente congelada em gelo seco e armazenada a -80 °C, para posterior extração de RNA. Parte do fígado e o coração foram imersos em solução de formol a 10%, para posterior análise histológica.

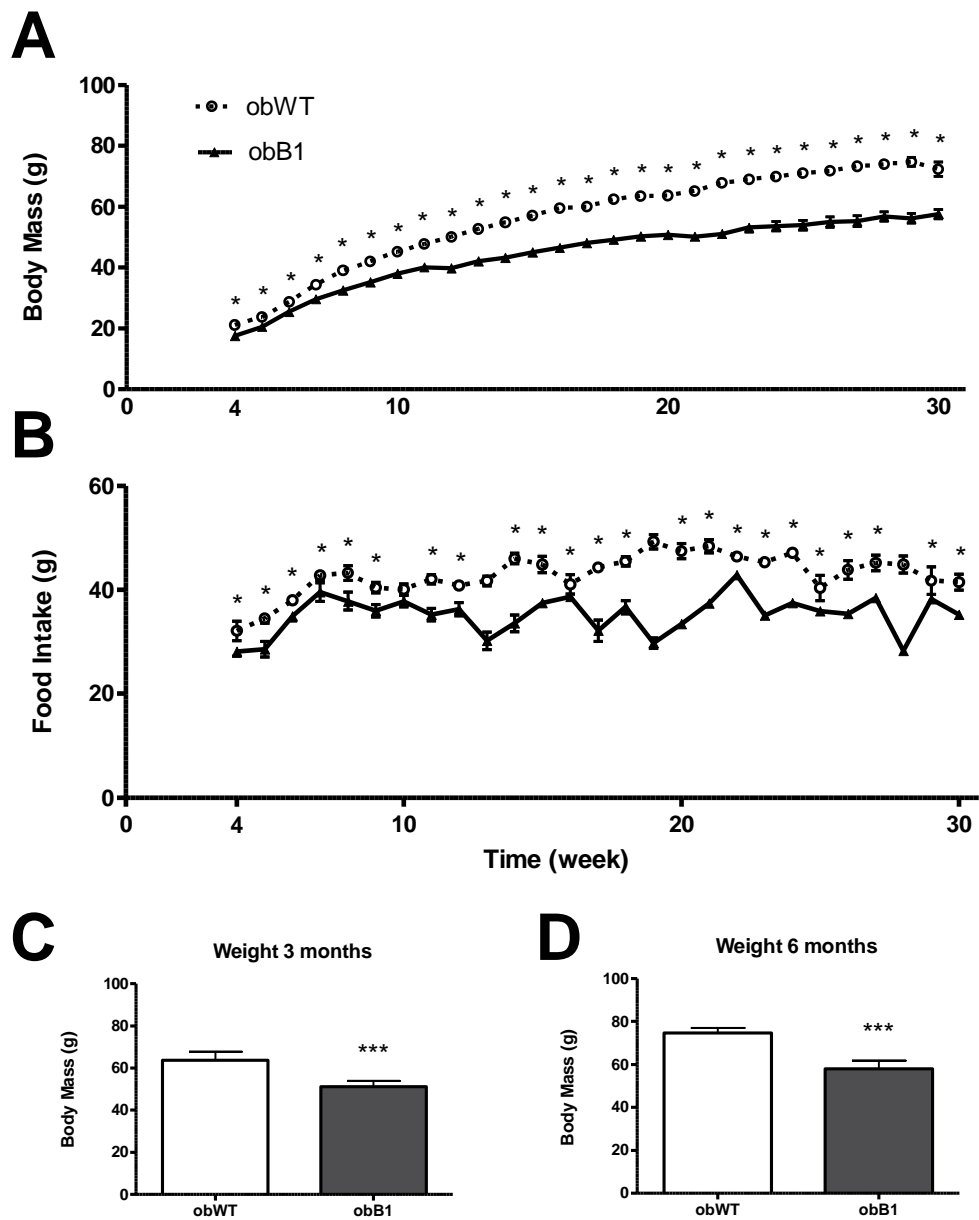
#### **4.10- Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EPM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste T de Student, quando comparados dois grupos e ANOVA seguido de Bonferroni para comparar mais que dois grupos. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todos os gráficos foram gerados e analisados no programa Graphpad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

## 5- Resultados

### **A deficiência do receptor B1 de cininas diminui a ingestão alimentar e a massa corporal**

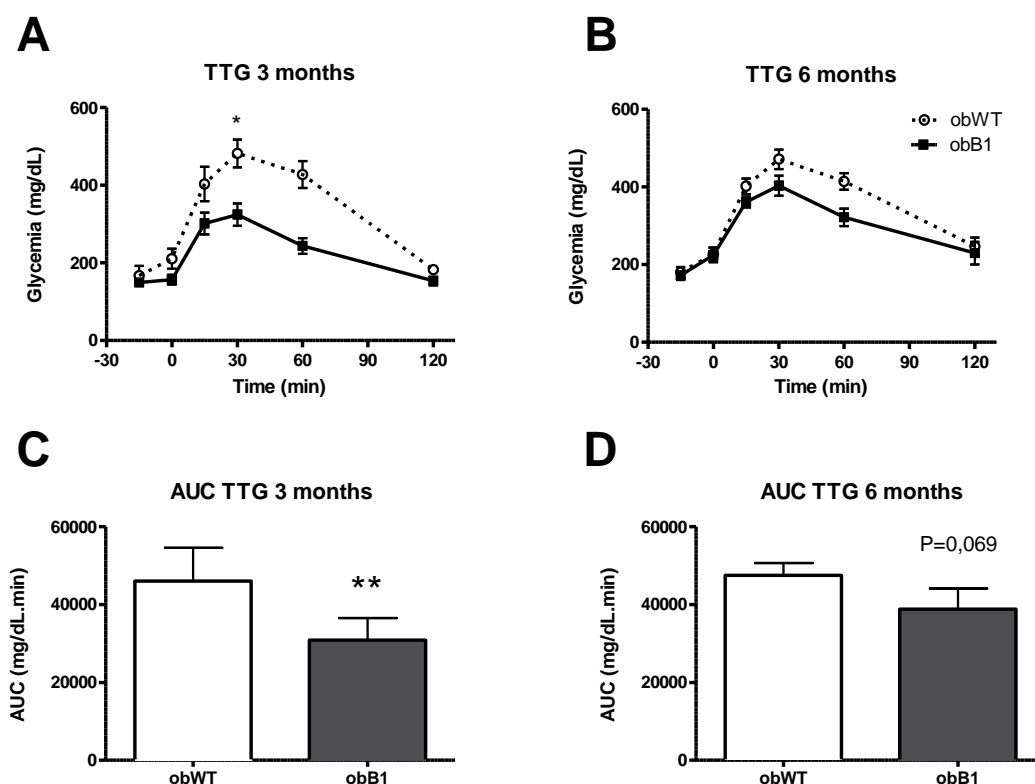
A principal característica de animais *ob/ob* é o aumento na ingestão de alimento e ganho de peso. A ausência do B1R nesse modelo teve como consequência uma menor massa corporal em relação aos animais controle *obWT* ( $p < 0,001$ ) (Figura 1 A). Sendo essa diferença observada, principalmente, em animais mais jovens; aos 3 meses de idade (*obWT*,  $63,79 \pm 1,59$ ; *obB1*,  $51,22 \pm 1,09$  g,  $p < 0,001$ ) do que aos 6 meses de idade (*obWT*,  $74,61 \pm 1,04$ ; *obB1*,  $57,98 \pm 1,58$  g,  $p < 0,001$ ; Figura 1C e D). Este efeito foi acompanhado pela menor ingestão alimentar dos animais *obB1* (Figura 1B). As diferenças entre os grupos *obWT* e *obB1* foram observadas durante todo o período avaliado (4<sup>o</sup> a 30<sup>o</sup> semana de vida).



**Figura 1. Massa corpórea e ingestão alimentar.** A) massa corporal de camundongos obWT e obB1 até 30 semanas de idade; B) ingestão alimentar de camundongos obB1 e obWT até 30 semanas de idade; C e D) comparação de massa corporal de camundongos obB1 e obWT com 3 e 6 meses de idade. obWT, camundongos deficientes para leptina; obB1, camundongos deficientes para leptina e nocautes para o receptor B1 de cininas. Valores apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n = 15$ , \*,  $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### A deficiência do receptor B1 de cininas melhora a captação de glicose

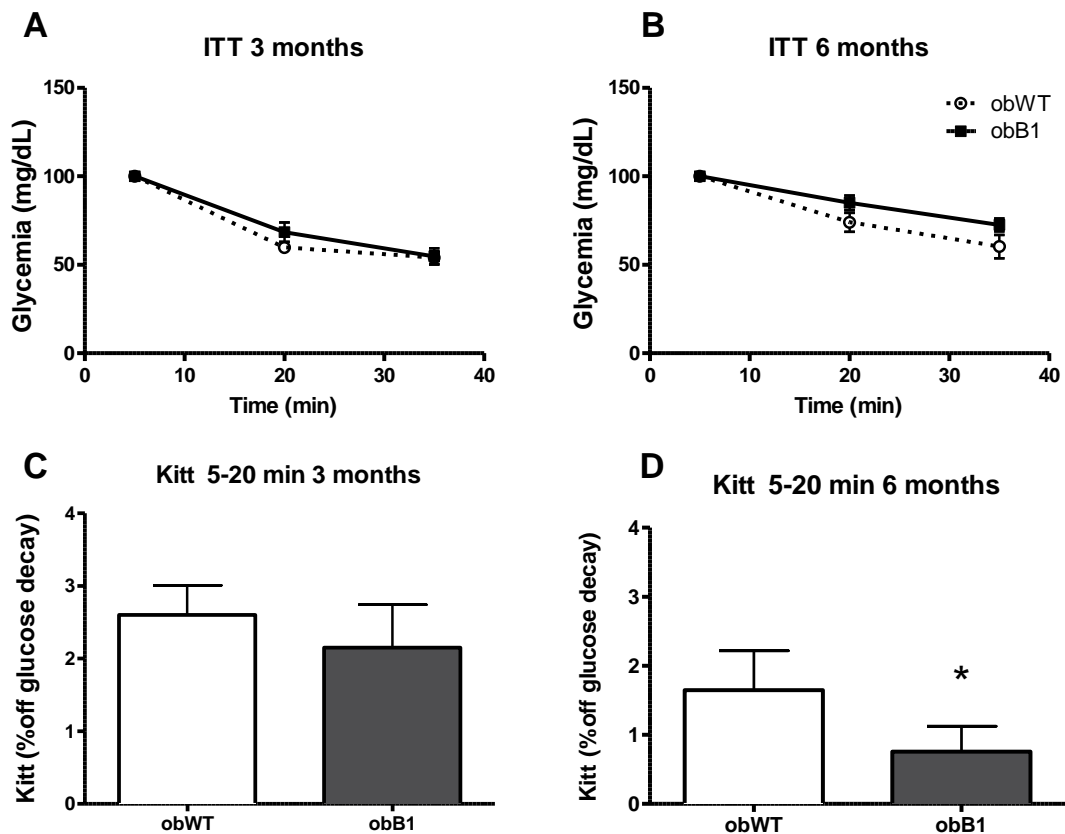
No TTG, os animais obB1 apresentaram uma maior captação de glicose aos 3 meses de idade (obWT,  $46045 \pm 3492$ ; obB1,  $30875 \pm 2311$  (mg/dL).min,  $p < 0,01$ ; Figura 2 A e C). Entretanto, aos 6 meses foi observada somente uma tendência a melhor captação à glicose nos animais obB1 em relação aos seus controles (Figura 2B e D;  $p = 0,069$ ).



**Figura 2. Teste de tolerância à glicose (TTG) de camundongos obB1 e seus controles obWT.** A) curvas glicêmicas aos 3 meses de idade; B) curvas glicêmicas aos 6 meses de idade; C) área sob a curva (AUC) de A; D) área sob a curva de B. Os testes glicêmicos foram realizados após 4 horas de jejum dos animais. obWT, camundongos deficientes para leptina; obB1, camundongos deficientes para leptina e nocautes para o receptor B1 de cininas. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM., \* $p < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ . N = 6.

### A deficiência do receptor B1 de cininas diminui a sensibilidade à insulina em animais mais velhos

No TTI houve diferença significativa na taxa de desaparecimento da glicose (Kitt) aos 6 meses (Figura 3). A falta do receptor B1 de cininas reduziu a sensibilidade em relação à insulina nestes animais mais velhos (obWT,  $24,68 \pm 4,17$ ; obB1,  $11,38 \pm 2,60$  (mg/dL).min,  $p < 0,05$ ; Figura 3 D). Enquanto em animais mais jovens (3 meses) essa alteração não foi observada (obWT,  $3,74 \pm 1,25$ ; obB1,  $13,98 \pm 2,19$  (mg/dL).min,  $p < 0,01$ ; Figura 3 C).

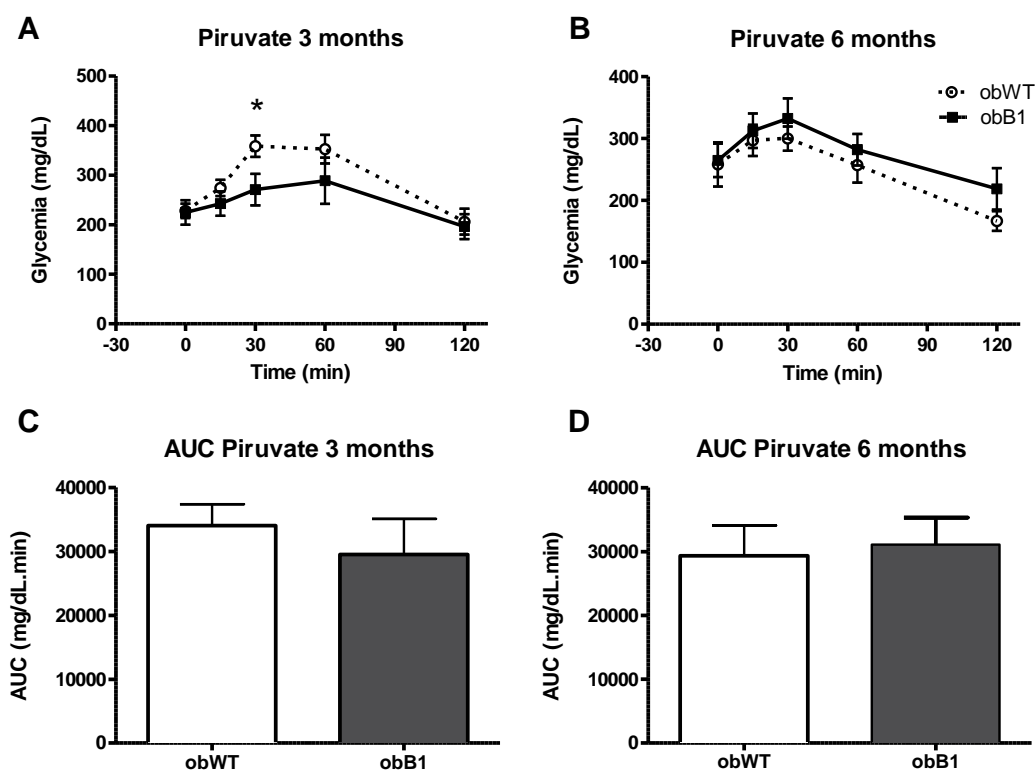


**Figura 3. Teste de tolerância à insulina (TTI) de camundongos obB1 e seus controles obWT.** A) TTI aos 3 meses de idade; B) TTI aos 6 meses de idade; C) Kitt em animais com 3 meses de idade; D) Kitt em animais com 6 meses de idade. Todos os testes foram realizados após jejum de 6 horas dos animais. obWT, camundongos deficientes para leptina; obB1, camundongos deficientes para leptina e nocautes para o receptor B1 de cininas. Os valores são apresentados com média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ .



### A Gliconeogênese de animais obB1 é diminuída em animais jovens

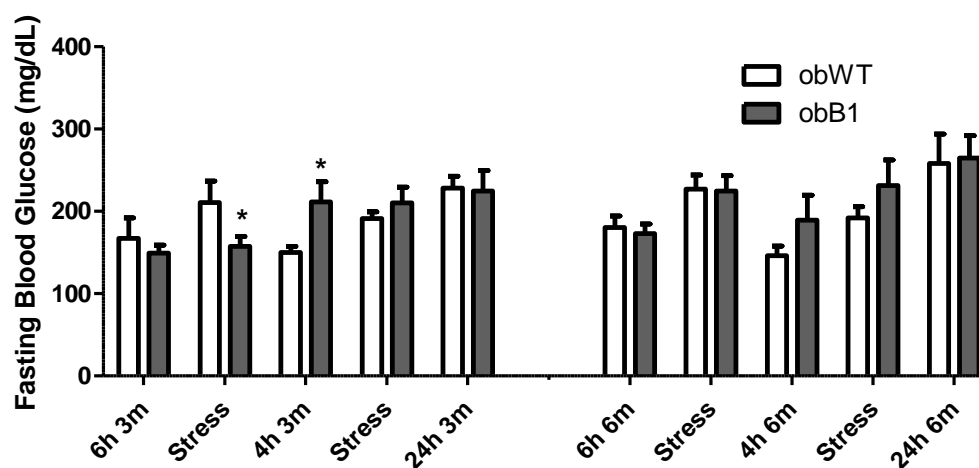
A capacidade dos animais obB1 e obWT em produzir glicose a partir de um substrato (gliconeogênese) foi avaliada por meio do desafio do piruvato. O teste mostrou que aos 3 meses de idade, os animais obB1 apresentaram menor produção de glicose que seu controle obWT, embora somente no tempo de 30 minutos após a injeção essa diferença foi significativa (obWT,  $358,7 \pm 21,6$ ; obB1,  $271,0 \pm 31,6$  (mg/dL).min,  $p < 0,05$ ; Figura 4 A). Aos 6 meses de idade não foi observado o mesmo efeito (Figura 4 B e D).



**Figura 4. Desafio do piruvato em camundongos obB1 e obWT.** A) curvas glicêmicas aos 3 meses de idade; B) curvas glicêmicas aos 6 meses de idade; C) área sob a curva (AUC) de A; D) área sob a curva (AUC) de B. Os testes foram realizados após 24 horas de jejum dos animais. obWT, camundongos deficientes para leptina; obB1, camundongos deficientes para leptina e nocautes para o receptor B1 de cininas. Os valores são apresentados com média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ . N = 6.

### Glicemia de jejum em diferentes tempos de jejum

Os níveis de glicose de jejum foram avaliados em diversos testes glicêmicos, em que os animais foram expostos a diferentes períodos de jejum e, posteriormente, a uma condição de estresse pela aplicação do teste. Pode-se constatar alterações somente aos 3 meses de idade, nas quais os animais obB1 apresentaram menor glicemia que seu controle obWT, na condição de estresse após jejum de 6 horas (Figura 5). Porém, esses mesmos animais, quando submetidos a 4 horas de jejum sem a condição de estresse, tiveram glicemia significativamente maior que seu controle obWT (Figura 5).



**Figura 5. Capacidade da glicemia de jejum em diferentes testes glicêmicos.**

Teste de tolerância à glicose (TTG) 4 horas de jejum; Teste de tolerância à insulina (TTI) 6 horas de jejum; Desafio do piruvato 24 horas de jejum. obWT, camundongos deficientes para leptina; obB1, camundongos deficientes para leptina e nocautes para o receptor B1 de cininas. Os valores são apresentados com média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ .

## A deleção do B1R diminui o depósito de tecido adiposo e aumenta a massa do fígado

A gordura intra-abdominal, avaliada pela soma do TA perirrenal com TA epididimal foi menor nos animais obB1 em relação ao seu controle obWT, tanto aos 3 meses de idade ( $8,24 \pm 0,26$  vs  $5,59 \pm 0,34$  g; obWT vs obB1 respectivamente, Tabela 1) quanto aos 6 meses de idade ( $7,64 \pm 0,34$  vs  $3,50 \pm 0,34$  g; obWT vs obB1 respectivamente, Tabela 1).

A massa do fígado, músculo e coração não apresentaram diferença entre os grupos aos 3 meses de idade. Contudo, a deleção do B1R parece aumentar a massa do fígado dos animais obB1 com 6 meses de idade ( $3,29 \pm 0,24$  vs  $4,09 \pm 0,06$  g; obWT vs obB1 respectivamente, Tabela 1).

Tabela 1- Massa de tecido e órgãos

Órgãos	3 meses				6 meses			
	obWT		obB1		obWT		obB1	
	Abs(g)	Rel(%)	Abs(g)	Rel(%)	Abs(g)	Rel(%)	Abs(g)	Rel(%)
Peso	$63,8 \pm 1,59$		$51,2 \pm 1,09^{***}$		$74,6 \pm 1,04$		$58,0 \pm 1,58^{***}$	
Fígado	$3,16 \pm 0,19$	$49,42 \pm 2,15$	$3,40 \pm 0,22$	$66,69 \pm 5,07^*$	$3,29 \pm 0,24$	$43,95 \pm 2,56$	$4,09 \pm 0,06^{**}$	$70,83 \pm 1,92^{***}$
TA epididimal	$5,00 \pm 0,15$	$78,42 \pm 1,89$	$3,57 \pm 0,25^{***}$	$69,58 \pm 4,33$	$4,55 \pm 0,23$	$60,91 \pm 2,62$	$1,93 \pm 0,19^{***}$	$32,93 \pm 2,43^{***}$
TA perirrenal	$3,24 \pm 0,14$	$50,74 \pm 1,74$	$2,02 \pm 0,13^{***}$	$39,26 \pm 1,89^{***}$	$3,09 \pm 0,16$	$41,43 \pm 1,88$	$1,57 \pm 0,19^{***}$	$26,87 \pm 2,87^{***}$
TA total	$8,24 \pm 0,26$	$129,1 \pm 3,01$	$5,59 \pm 0,34^{***}$	$108,8 \pm 5,40^{**}$	$7,64 \pm 0,34$	$102,34 \pm 3,74$	$3,50 \pm 0,34^{***}$	$59,80 \pm 4,47^{***}$
Músculo	$0,23 \pm 0,01$	$3,66 \pm 0,14$	$0,22 \pm 0,01$	$4,30 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,01$	$3,19 \pm 0,16$	$0,25 \pm 0,01$	$4,26 \pm 0,19^{***}$
Coração	$0,16 \pm 0,01$	$2,54 \pm 0,17$	$0,16 \pm 0,01$	$3,19 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,01$	$2,59 \pm 0,12$	$0,17 \pm 0,01$	$2,97 \pm 0,11^*$

Abs., peso absoluto (g); Rel., peso relativo (%). Valores apresentados como média  $\pm$  EPM, n = 6, \*  $p < 0,05$  vs controle; \*\*  $p < 0,01$  vs controle; \*\*\*  $p < 0,001$  vs controle.

## 6- Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar a participação do receptor B1 de cininas na fisiopatologia da obesidade e do DM2, em um modelo animal de obesidade (*ob/ob*) com uma mutação adicional de silenciamento do B1R, além de possíveis alterações decorrentes da idade. Animais *obB1* mostraram uma redução na ingestão e no ganho de peso, menor depósito de gordura, maior captação de glicose no TTG quando jovens, e aumento da resistência à insulina com o passar da idade para próximo da meia idade do modelo experimental.

A redução na massa corpórea e no depósito de gordura dos animais deficientes para o B1R, no modelo animal *ob/ob*, indica uma resistência a obesidade gerada por esta alteração genética. Sem a produção de leptina, os camundongos *ob/ob* têm um apetite muito aumentado e uma taxa de gasto energético reduzida, o que causa obesidade severa já nos indivíduos jovens (FRIEDMAN & HALAAS, 1998). Poucas alterações genéticas pontuais foram capazes de reduzir o desenvolvimento da obesidade neste modelo, como observado na deficiência do B1R no presente estudo. Este resultado confirma o que foi visto em outros trabalhos de nosso grupo e de outros no modelo *ob/ob*, em que o silenciamento do gene do B1R causa resistência à obesidade em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (MORI et al., 2008; FONSECA et al., 2013; MORAIS et al., 2015), além de alterações no metabolismo energético, especialmente, na homeostase da glicose (BARROS et al., 2012a; BARROS et al., 2012b; ARAUJO, et al., 2006; PESQUERO, et al., 2015). Desta forma, este resultado confirma novamente a participação do SCC na obesidade.

Uma importante hipótese levantada originalmente no presente trabalho é que as alterações observadas no metabolismo da glicose, assim como as alterações do tecido hepático são idade dependentes. Em um primeiro momento das análises, usando grupos de animais com 3 meses de idade, portanto adultos jovens, ficou evidente um melhor desempenho dos animais *obB1* no TTG, o que normalmente é interpretado como maior capacidade de captação de glicose. Na

mesma idade, entretanto, foi observada similar sensibilidade à insulina no TTI, o que a princípio pode parecer uma contradição. O fato da produção endógena de glicose estar reduzida nestes animais, como mostrado no teste com piruvato, esclarece em parte esta curva glicêmica mais baixa nos animais obB1, uma vez que a glicemia é fruto do equilíbrio entre a captação e a produção endógena de glicose. De outro lado, isso pode também indicar uma maior capacidade das ilhotas pancreáticas de produzir insulina, como demonstrado anteriormente em um modelo deficiente para leptina e para os dois receptores de cininas (BARROS et al., 2012a).

Nos animais obB1B2, ilhotas pancreáticas foram isoladas, e sua capacidade de secretar insulina foi testada *in vitro* em animais adultos jovens e também aos 6 meses de idade. Ilhotas dos animais sem receptores de cininas apresentava o dobro de capacidade de produzir insulina do que seus controles, diferença que desaparecia aos seis meses (BARROS et al., 2012a). Em camundongos de 6 meses de idade foi observado, também, um aumento da RI nos animais obB1 e uma redução da diferença entre as curvas do TTG, mostrando uma alteração no metabolismo energético e na homeostase da glicose. Estes eventos ocorrem independente dos reduzidos depósitos de gordura, que permaneceram bastante significativos mesmo nos animais mais velhos.

Também nos animais jovens, as alterações no tamanho do fígado não são evidentes, mas um aumento significativo ocorre nos animais mais velhos. Uma proteção ao fígado foi descrita e anteriormente associada ao silenciamento genético do B1R, supondo-se que o aumento compensatório da expressão do B2R pudesse ser o mecanismo envolvido na proteção hepática destes animais (WANG et al., 2008; FONSECA et al., 2013). No presente trabalho se pode verificar que com o passar da idade, os animais apresentaram aumento da massa absoluta e relativa deste órgão, acompanhando outras alterações do metabolismo energético. Estas diferenças, decorrentes da maior idade dos modelos, devem ser consideradas nas interpretações dos resultados dos trabalhos anteriormente publicados, pois apesar de parecer bastante benéfico, o silenciamento do B1R quanto à resistência a obesidade, estes efeitos podem

não ser interessantes nos indivíduos mais velhos e tais motivos devem ser investigados. Apesar da originalidade destes resultados, quanto ao silenciamento do gene do B1R, este efeito de idade dependente também foi observado em modelos semelhantes, deficientes para o receptor B2 ou para ambos os receptores de cininas (BARROS et al., 2012a; BARROS et al., 2012b).

Outra questão a ser considerada é a redução absoluta e relativa de depósito de gordura na forma de TAB intra-abdominal. Esta redução de TA nos obB1 foi independente do efeito idade. Já está bem aceito que o aumento da resistência à insulina em indivíduos obesos está associado a uma inflamação subclínica do TAB, o qual libera quantidades consideráveis de citocinas como TNF $\alpha$ , entre outras dezenas de substâncias produzidas no TA (FALLOIA et al., 2012). Estes fatores inflamatórios aumentam a resistência à insulina em diversos tecidos predispondo a DM2 (FALLOIA et al., 2012; CASTRO et al., 2014; SEARS & PERRY, 2015). Desta forma, a redução de tecido adiposo no obB1 poderia ser uma das causas da melhor captação de glicose aos 3 meses. No entanto, isso não pode explicar as alterações observadas nos animais mais velhos. Entretanto, estas novas informações vêm a contribuir, significativamente, na compreensão da regulação do metabolismo energético, a qual é caracterizada pela sobreposição de diversos sistemas regulatórios em diversos níveis: sistêmicos, teciduais, celulares e intracelulares.

## 7- Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, neste trabalho, pode-se concluir que a deficiência do B1R protege contra a obesidade, promovendo redução do peso, da ingestão alimentar e depósito de tecido adiposo. Além disso, a exclusão do B1R tem um significativo impacto da homeostase da glicose. Portanto, os resultados reforçam a participação do SCC no metabolismo energético. Embora seja necessário um maior aprofundamento do papel do B1R na progressão de doenças com fundo inflamatório, estes resultados demonstram o potencial do B1R para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças metabólicas como obesidade e diabetes *mellitus*.

## 8- Referências Bibliográficas

ADA /Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech...[et. al.]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

ARAÚJO, R. C., MORI, M. A., MERINO, V. F., BASCANDS, J.L., SCHANSTRA, J.P., ZOLLNER, R.L., VILLELA, C.A., NAKAIE, C.R., PAIVA, A.C., PESQUERO, J.L., BADER, M., PESQUERO, J.B. Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biol Chem.* v.387, n.4, Apr 2006

BARROS, C. C.; ALMEIDA, S. S.; MORI, M. A.; VALERO, V. B.; HARO, A. S.; BATISTA, E. C.; ROSA, T. S.; BACURAU, R. F.; WURTELE, M.; ARAUJO, R. C. Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. *Int J Obes (Lond)* [S.l.], v. 33, n. 8, p. 938-44, Aug 2009.

BARROS, C. C.; HARO, A.; RUSSO, F. J.; SCHADOCK, I.; ALMEIDA, S. S.; RIBEIRO, R. A.; VANZELA, E. C.; LANZONI, V. P.; BARROS, F. C.; MORAES, M. R.; MORI, M. A.; BACURAU, R. F.; WURTELE, M.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C. Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. *PLoS One* [S.l.], v. 7, n. 7, p. e40573, 2012a.

BARROS, C. C.; HARO, A.; RUSSO, F. J.; SCHADOCK, I.; ALMEIDA, S. S.; REIS, F. C.; MORAES, M. R.; HAIDAR, A.; HIRATA, A. E.; MORI, M.; BACURAU, R. F.; WURTELE, M.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C. Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. *Lab Invest* [S.l.], v. 92, n. 10, p. 1419-27, Oct 2012b.



BHOOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 1-80, Mar 1992.

CAMPBELL, D. J. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J Med Biol Res.* v.33, n.6, p.665-77, Jun 2000.

CASTRO, A. B.; KOLKA, C. M.; KIM, S. P; BERGMAN, R. N.; Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* v. 58 n.6: p. 600–609, August 2014.

CHOE, S. S., HUH, J. Y., HWANG, I. J., KIM, J. I., KIM, J. B. Adipose Tissue Remodeling: its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol*, v.7, n.30, p., Apr 2016.

DESPRÉS, J.P., LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *NATURE.* V. 444, n.14, Dec 2006

DIABETES CARE, VOLUME 33, SUPPLEMENT 1, JANUARY 2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus – ADA

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 99-104, Mar 1993.

DUCHENE, J., AHLUWALIA, A. The kinin B1 receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology.* v.9, p.125–131, 2009

ELLETT, J. D., EVANS, Z. P., ZHANG, G., CHAVIN, K. D., SPYROPOULOS, D. D. A Rapid PCR-based Method for the Identification of ob Mutant Mice. *Obesity.* v.17, p. 402–404, 2008.

ESTRELA, G. R.; WASINSKI, F.; ALMEIDA, D. C.; AMANO, M. T.; CASTOLDI, A.; DIAS, C. C.; MALHEIROS, D. M.; ALMEIDA, S. S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; PESQUERO, J. B.; BARROS, C. C.; CAMARA, N. O.; ARAUJO, R. C. Kinin B1 receptor deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by modulating immune cell migration. *J Mol Med (Berl)* [S.l.], v. 92, n. 4, p. 399-409, Apr 2014.

FALIOIA, E.; MICHETTI, G.; DE ROBERTIS, M.; LUCONI, M. P. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012.

FONSECA, R. G.; SALES, V. M.; ROPELLE, E.; BARROS, C. C.; OYAMA, L.; IHARA, S. S.; SAAD, M. J.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. B. Lack of kinin B(1) receptor potentiates leptin action in the liver. *J Mol Med (Berl)* [S.l.], v. 91, n. 7, p. 851-60, Jul 2013.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* [S.l.], v. 395, n. 6704, p. 763-70, Oct 22 1998.

Global report on diabetes. WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/global-report/en/index.html>>. Acessado em: 05/07/2016.

GUNAWARDANA, S. C. Benefits of healthy adipose tissue in the treatment of diabetes. *World J Diabetes*. v.5, n.4, p. 420-430, August 2014

International Diabetes Federation. Disponível em: <<http://www.idf.org/metabolic-syndrome/faqs#four>>. Acessado em: 14/07/2016.

JUNG, C. H., KIM, M.-S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch. Pharm. Res*. v. 36, p. 201–207, 2013.

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

KWON, H., PESSIN, J. E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. v.12, n. 4, Jun 2013.

LEEB-LUNDBERG, L.M., MARCEAU, F., MÜLLER-ESTERL, W., PETTIBONE, D.J., ZURAW, B. L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.*v.57, n.1, p.27-77, Mar 2005.

Ministério da Saúde / Vigitel 2014. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/80/553a243c4b9f3.pdf>>. Acessado em: 14/07/2016.

MORI, M. A.; ARAUJO, R. C.; REIS, F. C.; SGAI, D. G.; FONSECA, R. G.; BARROS, C. C.; MERINO, V. F.; PASSADORE, M.; BARBOSA, A. M.; FERRARI, B.; CARAYON, P.; CASTRO, C. H.; SHIMUTA, S. I.; LUZ, J.; BASCANDS, J. L.; SCHANSTRA, J. P.; EVEN, P. C.; OLIVEIRA, S. M.; BADER, M.; PESQUERO, J. B. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* [S.l.], v. 57, n. 6, p. 1491-500, Jun 2008.

MORI, M. A., SALES, V. M., MOTTA, F. L., FONSECA, R. G., ALENINA, N., et al. Kinin B1 Receptor in Adipocytes Regulates Glucose Tolerance and Predisposition to Obesity. *PLoS ONE*. v.7, n.9, 2012.

MORAIS, L. R.; SILVA, D. E.; Sales, V. M.; SILVA, R. F.; MORI, M. A.; BADER, M.; PESQUERO, J. B. Kinin B1 and B2 receptor deficiency protects against obesity induced by a high-fat diet and improves glucose tolerance in mice. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. v.8, p. 399–407, 2015.

SEARS, B., PERRY, M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids in Health and Disease*. v.14, n. 121, 2015

PESQUERO, J. B.; MORAIS, R.; SALES, V.; MORI, M.; BADER, M.; SILVA, E.; SILVA, R. Kinin B1 and B2 receptor deficiency protects against obesity induced by a high-fat diet and improves glucose tolerance in mice. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: targets and therapy* , v. 8, p. 399-407, 2015.

WANG, P. H. M., CAMPANHOLLE, G., CENEDEZE, M. A., FEITOZA, C. Q., GONÇALVES, G. M. LANDGRAF, R. G., JANCAR, S., PESQUERO, J. B. PACHECO-SILVA, A., CÂMARA N. O. S. Bradykinin B1 Receptor Antagonism Is Beneficial in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One* [S.I.]. v. 3, n.8, Aug 2008.

World Health Organization. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acessado em:  
14/07/2016.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., FRIEDMAN, J.M. Positional Cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1; 372 (6505):425-32. Dec 1994.