

RAFAEL LEITE TAVARES DE MORAIS

**O PAPEL DO SISTEMA CALICREÍNA-CININAS NA
OBESIDADE E SUA RELAÇÃO COM A INFLAMAÇÃO
EM CAMUNDONGOS $B_1B_2^{-/-}$**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Campus São
Paulo – para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2010

Morais, Rafael Leite Tavares de

O papel do sistema calicreína-cininas na obesidade e sua relação com a inflamação em camundongos $B_1B_2^{-/-}$ / Rafael Leite Tavares de Moraes. -- São Paulo, 2010.

xvii, 69 p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Título em inglês: The role of kallikrein-kinin system in obesity and its relation with inflammation in $B_1B_2^{-/-}$ mice.

1. Cininas 2. Obesidade 3. Inflamação 4. $B_1B_2^{-/-}$

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

Chefe do Departamento

Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Profa. Dra. Helena B. Nader

SÃO PAULO

2010

RAFAEL LEITE TAVARES DE MORAIS

O PAPEL DO SISTEMA CALICREÍNA-CININAS NA OBESIDADE E
SUA RELAÇÃO COM A INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS $B_1B_2^{-/-}$

BANCA EXAMINADORA

Presidente Nome: Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Assinatura:.....

Examinador (a) Nome: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Assinatura:.....

Examinador (a) Nome: Profa. Dra. Rosely Oliveira Godinho

Assinatura:.....

Examinador (a) Nome: Profa. Dra. Mariana Silva Araújo

Assinatura:.....

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica da
Universidade Federal de São Paulo sob apoio financeiro da Fundação
de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES).

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro...”

Albert Einstein

À minha família pelo apoio e encorajamento em seguir neste fascinante mundo que é a pesquisa científica, à Clarissa por esses dois maravilhosos anos juntos e aos meus amigos por todos esses anos de festas, viagens e muitos batatões!

Ao **Prof. Dr. João Bosco Pesquero** por todo o conhecimento científico
e pela formação ética adquirida.

À todos colegas do laboratório do Prof. Dr. João Bosco Pesquero pela ajuda nesses anos em que estive trabalhando. **Alessander, Aline, Bob, Carol, Daniele, Eduardo, Emanuel, Elice, Élton, Érika, Fabiana, Felipe, Fernanda, Hugo, Juliana, Luara, Paola, Paulinha, Raphael, Regiane, Rodrigo, Tina, Thaís, Thiago, Valéria e Vicência.**

Aos professores, **Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, Dr. Antônio de Miranda, Dr. Clóvis Ryuichi Nakaie, Dra. Dulce Elena Casarini, Dr. Jair Ribeiro Chagas e Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo** pela orientação e ajuda oferecida nesses anos.

Aos **bioteristas** do CEDEME e o do ECB pelos cuidados com os animais, sendo assim essenciais para a realização deste trabalho. Em particular ao **Emanuel, Heloísa** e ao **Mauro**.

Ao **Departamento de Biofísica**, seus professores e funcionários, pelo convívio e pela ajuda para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial aos técnicos **Nélson, Ivan, Emanuel e Juliana**, secretários **Fernandes, Paola e Ilza** e ao *webmaster* **Cléber**.

À **Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina**, seus funcionários e professores, especialmente os do curso biomédico, pela excelente formação.

À **Bio 38**, pelos 4 anos vividos intensamente em festas, churrascos e interbios...**Taquí !!!**

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

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

SUMÁRIO

I. LISTAS	xiii
I.I. LISTA DE FIGURAS	xiv
I.II. LISTA DE ABREVIACÕES	xvi
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
2.1. A obesidade como estado pr-inflamatório	4
2.2. Inflamação e resistência  insulina	7
2.3. O sistema calicreína-cininas e suas funções	11
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral	18
3.1.1. Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Animais	20
4.2. Genotipagem	20
4.3. Dietas	20
4.4. Teste de tolerância  glicose e sensibilidade  insulina	21
4.5. Dosagens bioquímicas	21
4.6. Tratamento agudo de LPS	21
4.7. Extração de RNA total	21
4.8. Síntese de DNA complementar (cDNA)	22
4.9. RT-PCR em tempo-real	22
4.10. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Genotipagem dos camundongos WT e B ₁ B ₂ ^{-/-}	25
5.2. Tratamento com as dietas controle e hiperlipídica	27
5.3. Teste de tolerância  glicose e sensibilidade  insulina	31

5.4. Dosagem sérica de insulina e leptina	36
5.5. Dosagem sérica de citocinas após tratamento com as diferentes dietas	39
5.6. Análise de expressão gênica após tratamento com as diferentes dietas	41
6. DISCUSSÃO	48
7. BIBLIOGRAFIA	62

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Obesidade e inflamação.	6
Figura 2. Possíveis mecanismos da ativação da inflamação nos adipócitos.	10
Figura 3. O Sistema Calicreína-Cininas.	12
Figura 4. Genotipagem de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ para o gene do receptor B_1 de cininas.	25
Figura 5. Genotipagem de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ para o gene do receptor B_2 de cininas.	26
Figura 6. Ganho de massa corporal em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com dieta controle por 12 semanas.	27
Figura 7. Ganho de massa corporal em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com dieta hiperlipídica por 12 semanas.	28
Figura 8. Calorias Ingeridas por camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas.	29
Figura 9. Eficiência alimentar em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas.	30
Figura 10. Teste de tolerância à glicose em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle por 12 semanas.	32
Figura 11. Teste de tolerância à glicose em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta hiperlipídica por 12 semanas.	33
Figura 12. Teste de sensibilidade à insulina em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle por 12 semanas.	34
Figura 13. Teste de sensibilidade à insulina em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta hiperlipídica por 12 semanas.	35
Figura 14. Dosagem sérica de insulina por ELISA em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas.	36
Figura 15. Dosagem sérica de leptina por ELISA em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas.	38
Figura 16. Dosagem sérica de proteína C-reativa e MCP-1 por ELISA em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas.	40

-
- Figura 17.** Expressão gênica de TNF-alfa em tecido adiposo de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas. **42**
- Figura 18.** Expressão gênica de TNF-alfa em músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas. **43**
- Figura 19.** Expressão gênica de MCP-1 em tecido adiposo de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas. **44**
- Figura 20.** Expressão gênica de MCP-1 em músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas. **45**
- Figura 21.** Expressão gênica de proteína C-reativa em fígado de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas. **46**
- Figura 22.** Expressão gênica de IL-6 em tecido adiposo e músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 12 semanas. **47**

LISTA DE ABREVIACÕES

Arg – arginina

B₁^{-/-} - camundongo nocaute para o receptor B₁ de cininas

B₂^{-/-} - camundongo nocaute para o receptor B₂ de cininas

B₁B₂^{-/-} - camundongo nocaute para os receptores B₁ e B₂ de cininas

BK – bradicinina

CCR – receptor de quimiocinas

CCX – moléculas quimiotáticas

cDNA - DNA complementar

CPM – carboxipeptidase M

CRP – proteína C reativa

DBK - des-Arg⁹-bradicinina

DHL – dieta hiperlipídica

DNA - ácido deoxirribonucleico

dNTPs – deoxiribonucleotídeos

DTT – ditioneitol

ECA – enzima conversora de angiotensina I

ELISA – *enzyme linked immuno sorbent assay*

GLUT4 – transportador de glicose do tipo 4

GRK – receptor de quinase acoplado à proteína G

HEK 293 – linhagem celular de rim de embrião humano

ICAM – molécula de adesão intracelular

IL – interleucina

IKKβ - inibidor do fator nuclear-κB quinase-β

i.p. – intraperitoneal

IRS1 - substrato receptor de insulina 1

JNK - JUN N-terminal quinase

LPS - lipopolissacarídeo de E. Coli

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 - proteína quimioatrativa de monócitos

M-MLV - *moloney murine leukemia virus*

mRNA - RNA mensageiro

NF-kB - fator nuclear kB

NO - óxido nítrico

pb - pares de bases

PCR - reação de polimerase em cadeia

RNA - ácido ribonucleico

RE – retículo endoplasmático

RT – transcrição reversa

SCC - sistema calicreína-cininas

SOCS - supressor da sinalização de citocinas

TLR – *toll-like receptor*

TNF-alfa - fator de necrose tumoral alfa

VCAM – molécula de adesão vascular celular

WT - camundongo selvagem (C57Bl/6)

RESUMO

O sistema calicreína-cininas desempenha funções estabelecidas em diversos processos biológicos como transmissão de dor, controle da pressão arterial, geração e manutenção do estado inflamatório. Neste presente trabalho nós mostramos, pela primeira vez, a relação do sistema calicreína-cininas a processos metabólicos em camundongos nocaute para ambos os receptores B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}).

Os camundongos B₁B₂^{-/-} foram protegidos do desenvolvimento de obesidade induzida pelo tratamento com dieta hiperlipídica por doze semanas. Além disso, apresentaram menor ingestão alimentar, prevenção da intolerância à glicose, parcial proteção ao desenvolvimento de resistência à insulina e reduzidos níveis circulantes dos hormônios insulina e leptina. A expressão gênica da citocina TNF-alfa e da proteína C-reativa, componentes importantes de processos inflamatórios, estavam reduzidas em tecidos chaves no metabolismo energético, como tecido adiposo, músculo esquelético e fígado.

Com isso, sugerimos que as reduzidas concentrações de insulina levaram ao aumento da utilização do tecido adiposo como fonte energética, por meio do processo de lipólise, protegendo o animal B₁B₂^{-/-} contra o ganho de massa corporal. Além da diminuída expressão de TNF-alfa e proteína C-reativa, demonstramos neste trabalho que a ausência funcional do sistema calicreína-cininas apresenta relação direta com o metabolismo e o sistema imune, sendo uma alternativa ao tratamento de patologias como diabetes tipo 2 e obesidade.

INTRODUÇÃO

2.1. A obesidade como estado pró-inflamatório

A Organização Mundial de Saúde estima que no mundo há cerca de 1 bilhão de adultos com sobrepeso, sendo 300 milhões destes considerados obesos (1). Desde 1980, a taxa de obesidade vem crescendo mais do que três vezes em algumas áreas da América do Norte, Reino Unido, Leste Europeu, Oriente Médio, Ilhas do Pacífico, Australásia e China (2).

O ganho de peso e a obesidade são os maiores fatores de risco para as patologias que compõem a síndrome metabólica, as quais incluem diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, doença hepática gordurosa não alcoólica, artrite, asma e certas formas de cânceres (2). A obesidade e o diabetes tipo 2 talvez sejam as doenças relacionadas à síndrome metabólica que mais se correlacionam. Segundo a OMS, nove entre dez pacientes diabéticos são obesos ou apresentam sobrepeso (1). Além do mais, é bem descrita a relação entre obesidade e diabetes tipo 2 na literatura (3, 4).

Com a recente tendência dos indivíduos se tornarem mais obesos, espera-se um grande aumento da prevalência na resistência à insulina nos países ocidentais. A resistência à insulina, juntamente associada com a hiperinsulinemia, hiperglicemia e a presença de mediadores pró-inflamatórios podem levar ao estado de disfunção endotelial vascular, um perfil lipídico anormal, hipertensão e inflamação vascular, todos os quais podem promover o desenvolvimento de doenças cardiovasculares arterioscleróticas (5).

Para se entender o desenvolvimento e os mecanismos pelos quais a obesidade é determinada é preciso compreender o papel do tecido adiposo, um dos

principais órgãos periféricos envolvidos neste processo, juntamente com o músculo esquelético e fígado.

O tecido adiposo não é mais considerado somente um tecido com a capacidade de estocar energia, mas sim como um importante órgão endócrino regulador em diversos processos patológicos. Vários produtos sintetizados pelo tecido adiposo têm sido identificados e caracterizados com a denominação de adipocinas. Embora nem todas as adipocinas sejam sintetizadas exclusivamente pelos adipócitos, as adipocinas são importantes fatores que ligam obesidade, resistência à insulina e desordens inflamatórias (6-8).

A adiponectina e a leptina são as adipocinas mais abundantes produzidas pelos adipócitos, embora outros produtos tenham sido caracterizados, tais como certas citocinas, as quais incluem: fator de necrose tumoral alpha (TNF-alfa), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1); mediadores do processo de coagulação, tal como inibidor de ativador de plasminogênio tipo 1, e certos fatores do complemento (6,7). Esses produtos exercem funções já estabelecidas no sistema imune, e embora alguns deles sejam produzidos pelos adipócitos, eles não são normalmente considerados adipocinas; apesar disso, eles desempenham importantes papéis na interface entre a imunidade e o metabolismo.

A obesidade está associada com uma resposta inflamatória crônica, a qual é caracterizada pela anormal produção de citocinas, aumento da síntese de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa (CRP), e ativação de sinalização pró-inflamatória (6). Embora as vias de sinalização pró-inflamatórias estejam ativadas no próprio tecido adiposo durante a obesidade, a relativa contribuição dos adipócitos como fonte de citocinas circulantes e sistematicamente ativas, adipocinas e quimiocinas não está totalmente clara. O tecido adiposo de indivíduos obesos

contém um grande número de macrófagos, os quais são uma fonte adicional de mediadores solúveis (9,10). Contudo, embora os macrófagos pareçam ser a principal fonte de TNF-alfa no tecido adiposo, os adipócitos contribuem com quase um terço da concentração de IL-6 na circulação de pacientes obesos (11) (Figura 1):

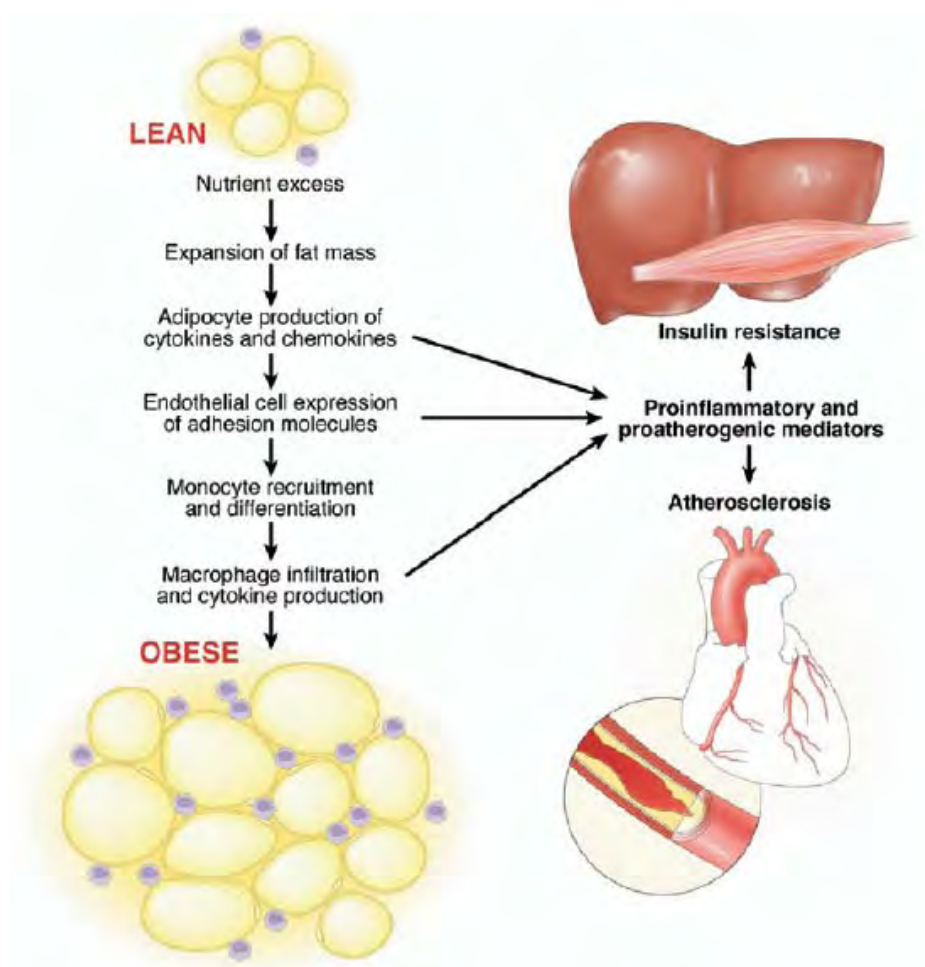


Figura 1. Obesidade e inflamação. Esquema ilustrativo da obesidade levando ao processo inflamatório e conseqüente patologias como resistência à insulina e arterosclerose. Shoelson, S.E., Herrero, L., Naaz, A. *Gastroenterology* (2007).

A quimiocina MCP-1 produzida pelos adipócitos tem sido identificada recentemente como um potente fator no processo de filtração dos macrófagos dentro do tecido adiposo (12). Uma vez que os macrófagos estejam presentes e ativos no tecido adiposo, eles, juntamente com adipócitos e outras células presente no tecido,

podem regular um ciclo no qual ocorrerá o recrutamento e a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, estudos populacionais demonstram fortes correlações entre os níveis de marcadores pró-inflamatórios, tais como proteína C-reativa, IL-6 e TNF-alfa, e variações na homeostase glicêmica, obesidade e arterosclerose. Contudo, embora correlações epidemiológicas têm sido estabelecidas, pouco se sabe sobre o mecanismo celular e molecular que ligue obesidade e resistência à insulina (5).

2.2. Inflamação e resistência à insulina

A insulina regula a captação, oxidação e o estoque energético nos tecidos sensíveis a insulina, tais como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. A obesidade, em particular a obesidade visceral, a qual é a acumulação de tecido adiposo dentro da cavidade abdominal, é associada com a resistência aos efeitos da insulina na utilização da glicose e dos ácidos graxos periféricos, geralmente levando ao desenvolvimento do diabetes tipo 2, a qual é uma doença progressiva caracterizada pela resistência à insulina e pela perda da secreção da insulina pelas células β do pâncreas (5).

A inflamação crônica sistêmica tem sido proposta em ter um importante papel na patogênese da obesidade relacionada a resistência à insulina (6,13). Marcadores da inflamação, como TNF-alfa, IL-6 e CRP, estão presentes em concentrações crescentes em indivíduos que são obesos e apresentam resistência à insulina, e esses marcadores predizem o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares.

A primeira ligação entre obesidade, aumento da expressão da citocina pró-inflamatória TNF-alfa e a ação da insulina foi relatada por Hotamisligil e colegas (13). Eles demonstraram em roedores que os adipócitos expressam diretamente TNF-alfa, deixando a concepção do papel da inflamação na obesidade. Esse trabalho foi realizado no mesmo momento em que se demonstrava o aumento da expressão de TNF-alfa em humanos obesos, e a diminuição de sua expressão após a perda de peso (14).

Evidências suportando o papel chave do TNF-alfa na obesidade relacionada a resistência à insulina surgiram após estudos demonstrando que camundongos *ob/ob* (camundongos deficientes na produção de leptina que apresentam resistência à insulina) os quais também eram deficientes para TNF-alfa e receptores de TNF-alfa, obtiveram significativa melhora na sensibilidade à insulina quando comparados com camundongos *ob/ob* suficientes para TNF-alfa e receptores de TNF-alfa (15).

À procura de mecanismos envolvidos na resistência à insulina induzida pela inflamação, Yuan e colaboradores (2001) identificaram o inibidor do fator nuclear- κ B (NF- κ B) quinase- β (IKK β), o qual participa como mediador da resistência à insulina induzida por TNF-alfa. Eles demonstraram que a superexpressão de IKK β em linhagem celular embrionária de rim (linhagem celular HEK293) atenuou a sinalização da insulina, e que camundongos *ob/ob* expressando somente uma cópia do gene codificante para IKK β foram protegidos contra o desenvolvimento de resistência à insulina (16).

A proteína JUN N-terminal quinase (JNK), parte da família das serina/treonina quinases, as quais são ativadas por diversos estímulos inflamatórios - incluindo TNF-alfa e ligação de Toll-like receptores (TLRs) – são também importantes reguladores da resistência à insulina em modelos de camundongos obesos (17). Em ambos os modelos de obesidade (genético ou por dieta), a atividade da JNK está aumentada

no fígado, músculo e tecido adiposo, sendo que a perda de JNK1 preveniu a resistência à insulina (17).

Outro importante mecanismo envolvido na resistência à insulina é o estresse no retículo endoplasmático (RE) (18). Esse estresse leva à supressão da sinalização através do receptor de insulina em hepatócitos de rato por meio da ativação de JNKs e subsequente fosforilação da serina do substrato receptor de insulina 1 (IRS1), um dos principais mediadores da sinalização da insulina e, portanto, controlador da sensibilidade à insulina. Além disso, estudos mostram que camundongos expressando somente uma cópia do gene codificador da proteína XBP1 (do inglês, X-box-binding protein 1), um fator de transcrição que regula um grande número de genes resposta ao estresse no RE, desenvolveram resistência à insulina (18). Outros fatores envolvidos na regulação da sensibilidade à insulina são IL-6 e várias proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) (19,20).

Portanto, diversas citocinas pró-inflamatórias, proteínas SOCS, estresse do RE, ativação de NF- κ B pela via de IKK β e as vias de sinalização de JNK estão todas associadas com o desenvolvimento da resistência à insulina, indicando que vários mediadores pró-inflamatórios liberados pelos adipócitos, em adição pela inicialmente descrita citocina pró-inflamatória TNF-alfa, ligam o sistema imune com a resistência à insulina relacionada à obesidade (Figura 2):

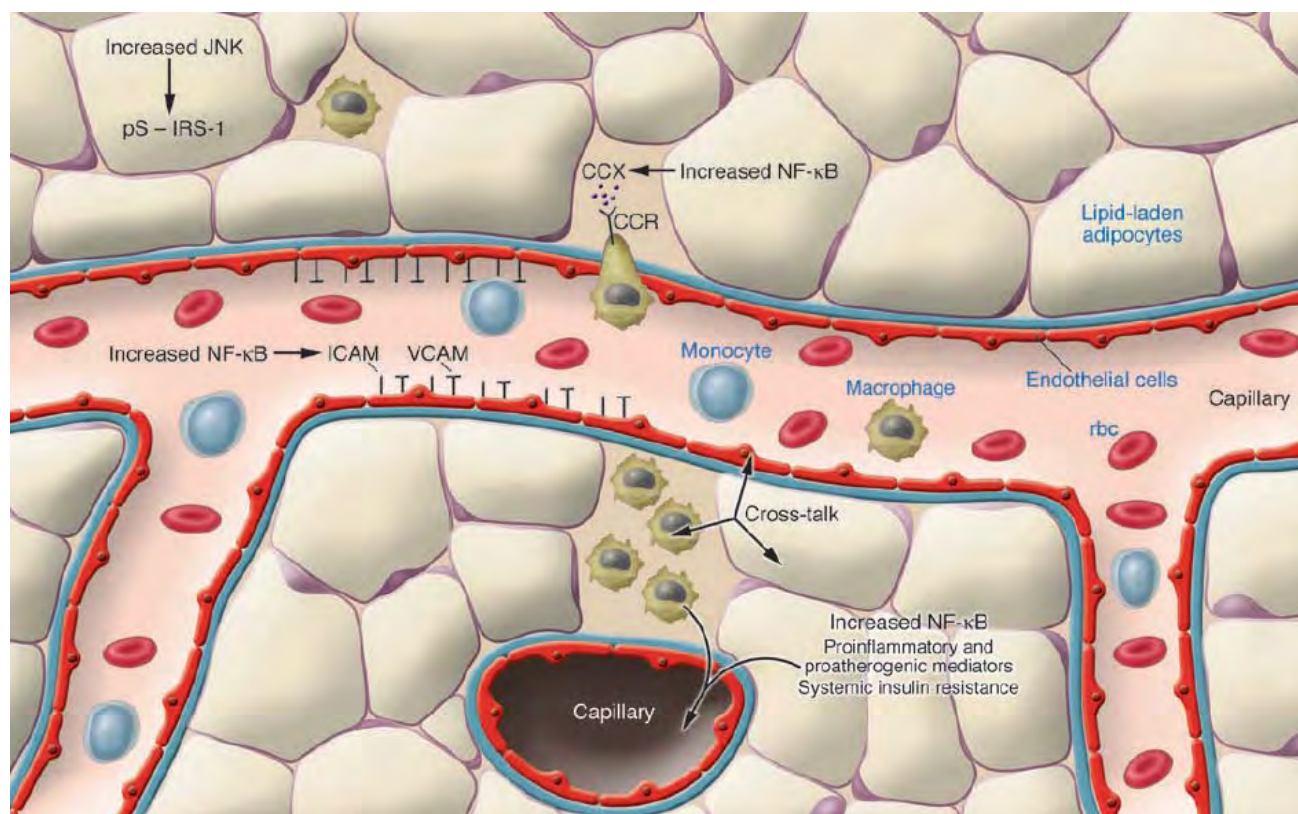


Figura 2. Possíveis mecanismos da ativação da inflamação nos adipócitos. ICAM, molécula de adesão intercelular; VCAM, molécula de adesão vascular celular; CCX, moléculas quimiotáticas e CCR, receptor de quimiocinas. Shoelson, S.E. et al (2006).

Estudos com camundongos deficientes na produção de $IKK\beta$ em hepatócitos demonstram que esses animais mantêm suficiente sensibilidade à insulina no fígado, no entanto desenvolvem resistência à insulina no músculo e tecido adiposo em resposta à dieta hiperlipídica, obesidade e envelhecimento (21). Pelo contrário, em camundongos deficientes de $IKK\beta$ em células mielóides, houve total proteção contra o desenvolvimento de resistência à insulina (21). Portanto, este estudo indica que células mielóides, provavelmente macrófagos, regulam a sensibilidade à insulina sistêmica e estão envolvidos na inflamação associada a resistência à insulina, visto que a expressão hepática de $IKK\beta$ é necessária para a ocorrência de resistência à insulina no fígado.

A ativação seletiva de NF- κ B, causando contínua diminuição dos níveis de IKK β , em hepatócitos de modelo de camundongo transgênico levou a moderada resistência à insulina (22). Neste estudo, a resistência à insulina foi diminuída pelo neutralização sistêmica de IL-6, o qual também resultou na diminuição da expressão de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 no fígado.

Portanto, não é somente uma complexa rede de mediadores que está envolvida na regulação da sensibilidade à insulina, mas vários tipos de células, como os adipócitos, hepatócitos, macrófagos e células musculares.

2.3. O sistema caliceína-cininas e suas funções

O sistema caliceína-cininas (SCC) está envolvido nos processos de transmissão de dor, controle da pressão arterial, no processo de geração e manutenção do estado inflamatório, atuando também no trato gastrointestinal (23-25). Além disso, o SCC tem um importante papel no processo de captação de glicose (26). De maneira geral, fazem parte desse sistema: 1- os substratos proteicos precursores, chamados de cininogênios; 2 - as enzimas que hidrolisam esses substratos, denominadas caliceínas; 3 - as cininas, peptídeos efetores desse sistema, que são os produtos da ação das caliceínas sobre os cininogênios; 4 - dois receptores distintos que foram caracterizados farmacológica e molecularmente, denominados receptores B₁ e B₂ de cininas; 5- enzimas que degradam as cininas (cininases) liberando os agonistas do receptor B₁ ou peptídeos inativos (Figura 3).

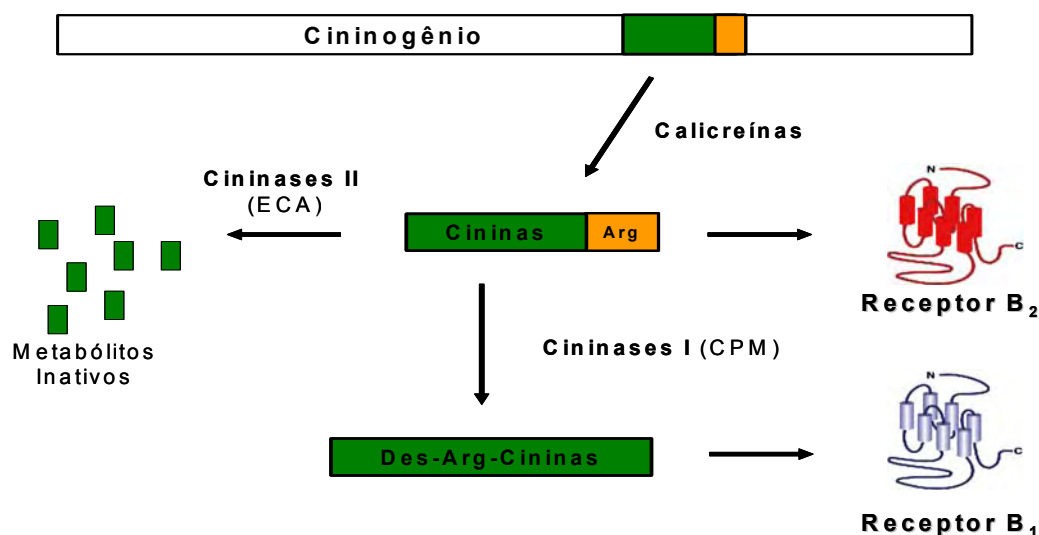


Figura 3. O Sistema Caliceína-Cininas. ECA, enzima conversora de angiotensina; CPM, carboxipeptidase M. Arg, arginina. Adaptado de Mori, M.A. et al (2007).

A cinina liberada pela caliceína plasmática humana, de rato ou de camundongo é a bradiginina (BK). As caliceínas de tecido humano liberam Lys-bradiginina (ou calidina) e a dos roedores liberam BK. A BK e a calidina podem ser degradadas pelas cininases do tipo I liberando des-Arg⁹-bradiginina (DBK) e des-Arg¹⁰-calidina, respectivamente, sendo estes peptídeos os principais agonistas do receptor B₁ (25).

Acredita-se que a maior parte das ações da BK e da calidina seja mediadas pelo receptor B₂. Esse receptor possui baixíssima afinidade pela DBK ou des-Arg¹⁰-calidina. Foi determinada a seqüência desse gene verificando-se que o mesmo codifica para uma proteína de 366 aminoácidos, com massa molecular de 41 kDa, pertencendo à família dos receptores que apresentam sete domínios transmembrânicos acoplado à proteína G (27).

Uma das importantes funções do receptor B₂ é a mediação da dor. A BK é capaz de provocar dor quando administrada por via intra-articular em animais de

laboratório pela ativação dos receptores B₂ em neurônios nociceptivos (23). Além disso, o receptor B₂ tem um papel importante no controle da pressão arterial (28). Em 1995, Borkowski *et al.* retiraram geneticamente o receptor B₂ em camundongos e observaram que os animais eram férteis e não apresentavam alterações no desenvolvimento. Mais tarde, Emanuelli *et al.* (1999) demonstraram que os animais nocaute B₂ tornavam-se hipertensos aos 60 dias de nascimento, apresentando também taquicardia e hipertrofia cardíaca.

Além da sua presença em vasos, o receptor B₂ está localizado em células de músculo esquelético de ratos (29). É conhecido que a BK liberada pelo músculo esquelético humano pode se ligar ao receptor B₂ e induzir captação de glicose (30,26). Dessa maneira, a BK é capaz de aumentar a sensibilidade sistêmica à insulina (31). Assim, camundongos nocautes para o receptor B₂ desenvolvem resistência à insulina e apresentam níveis plasmáticos elevados deste hormônio (32).

Em adipócitos, demonstrou-se que a BK pode induzir a fosforilação do receptor de insulina e seu substrato IRS1, resultando na translocação do GLUT4 e aumentando a captação de glicose (33,34). No entanto, existem outros estudos que mostram que a BK pode induzir a captação de glicose por uma via insulino-independente, estimulando diretamente a translocação de GLUT4 (35).

Os mecanismos de sinalização intracelular desencadeados pelo receptor B₁ assemelham-se aos descritos para o receptor B₂ (36). Em geral, estes dois receptores se associam às proteínas G_i e G_q e assim promovem hidrólise de inositolfosfato, elevação do cálcio intracelular, liberação de ácido araquidônico, produção de eucosanóides e de óxido nítrico (NO). Além disso, o receptor B₁, assim como o B₂, ativa as MAPKs por meio de uma via dependente de G_s (37).

Uma das poucas características que diferenciam o receptor B₁ do receptor B₂, além de sua afinidade pela DBK e do controle da transcrição de seu RNA mensageiro (mRNA), é o fato desse receptor praticamente não sofrer desensibilização pós-ativação (38-40). Diferentemente do receptor B₂, o receptor B₁ não apresenta sítios de serina e treonina na sua cauda C-terminal intracelular, os quais são necessários para o mecanismo de internalização via receptores de quinases acoplados à proteína G (GRKs) (41). Esta diferença certamente contribui para uma estimulação mais duradoura por parte do receptor B₁ e para os distintos padrões de sinalização celular entre os dois receptores de cininas em diferentes tipos celulares (36).

A fim de melhor esclarecer a função fisiológica do receptor B₁, Pesquero *et al.* geraram um camundongo nocaute para este receptor (B₁^{-/-}) (53). A forte hipotensão, característica do choque endotóxico, não ocorreu nesses animais após administração de LPS. Os animais B₁^{-/-} também se mostraram protegidos contra dor neuropática e hiperalgesia induzida pelo adjuvante inflamatório de Freud (42,43). Além disso, a ausência do receptor B₁ em animais B₁^{-/-} foi capaz de reduzir o processo de migração e apoptose de neutrófilos (44).

Além de suas conhecidas funções inflamatórias, recentemente nosso grupo demonstrou uma participação do receptor B₁ de cininas na modulação endócrina desempenhada pelo pâncreas. Observamos que camundongos B₁^{-/-} apresentavam níveis mais baixos de insulina sérica e que esta característica era resultado de um menor fluxo sanguíneo pancreático, o que prejudicava a liberação de insulina frente a um estímulo hiperglicêmico (45). Com isso, nós sugerimos pela primeira vez que o receptor B₁ poderia estar relacionado a processos metabólicos, em particular a homeostase glicêmica.

Utilizando camundongos $B_1^{-/-}$ observamos que esses animais apresentaram um fenótipo de proteção contra obesidade e intolerância à glicose mediante uma dieta hiperlipídica (DHL) em relação ao grupo controle (46). Essa proteção foi devido a uma série de fatores que vão desde sua baixa adiposidade até a inibição da ingestão alimentar e da lipogênese pós-prandial em DHL. Esses últimos fatores, por sua vez, seriam reflexos do aumento da sensibilidade a leptina nesses camundongos, resultado dos baixos níveis séricos de leptina encontrado nesses animais.

Outro trabalho realizado por nosso grupo mostra que camundongos $B_2^{-/-}$ apresentam, assim como o $B_1^{-/-}$, resistência ao fenótipo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (trabalho não publicado).

O uso de animais nocautes se mostra uma importante ferramenta para entender o papel do sistema calicreína-cinina na participação de processos inflamatórios, circulatórios e metabólicos. Não somente o uso de camundongos $B_1^{-/-}$ e $B_2^{-/-}$ vêm apresentando resultados significativos para se entender as diversas patologias relacionadas com o SCC. O desenvolvimento de animais $B_1B_2^{-/-}$ (duplo nocaute para os receptores B_1 e B_2) também vêm apresentando importantes resultados, sendo recentemente relatado que esses animais apresentam proteção contra hipotensão induzida por endotoxina (47). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto da ausência de ambos os receptores B_1 e B_2 no metabolismo energético e seu contexto na patologia da obesidade.

Como já dito, o sistema calicreína-cininas apresenta fortes evidências na participação da modulação de processos inflamatórios, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático, migração celular e também dor e hiperalgesia. Ambos os receptores B_1 e B_2 de cininas parecem estar profundamente envolvidos com as alterações observadas durante as desordens

inflamatórias de fase aguda e crônica. E durante as duas últimas décadas, diversos trabalhos relacionaram o sistema caliceína-cininas a processos de recrutamentos de leucócitos, síntese de citocinas e ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (48- 51).

A partir disso, entendemos que o estudo dos receptores B₁ e B₂ utilizando camundongos B₁B₂^{-/-} será importante para o entendimento do papel simultâneo desses receptores no processo de regulação do metabolismo energético e sua relação com a participação já descrita pelo sistema caliceína-cininas na inflamação.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o sistema caliceína-cinina em animais deficientes para os receptores B₁ e B₂ de cininas e sua relação entre obesidade e inflamação.

3.1.1. Objetivos específicos

- Verificar se camundongos B₁B₂^{-/-} apresentam fenótipo de proteção contra obesidade quando submetidos à dieta hiperlipídica em relação a camundongos controle WT (selvagem).
- Avaliar a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em camundongos WT e B₁B₂^{-/-} submetidos às dietas controle e hiperlipídica.
- Avaliar níveis séricos de insulina, leptina, TNF-alfa, IL-6, MCP-1 e proteína C-reativa em camundongos WT e B₁B₂^{-/-} submetidos às dietas controle e hiperlipídica.
- Avaliar níveis de expressão gênica tecidual de TNF-alfa, IL-6, MCP-1 e proteína C-reativa em camundongos WT e B₁B₂^{-/-} submetidos às dietas controle e hiperlipídica.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Nos experimentos foram utilizados animais da linhagem C57/BL6 (n=6 a 9 por grupo) nocautes para os genes dos receptores B₁ e B₂ (duplo nocaute B₁B₂^{-/-}) e animais controle B₁B₂^{+/+} aqui chamados de WT (wild-type). Os animais foram utilizados a partir dos trinta dias de vida, mantidos em gaiolas individuais em um ciclo de claro/escuro de 12h. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP e aprovado sob o nº de protocolo 01730/08.

4.2. Genotipagem

Para a genotipagem, um pequeno fragmento da cauda dos animais foi coletado e o DNA genômico extraído. Após esses procedimentos, foram executadas reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene do receptor B₁ (sense: 5' TGAAGCTGTGAGCTCTTTG 3' e antisense: 5' GCTACCCAGATGAGCAGGCA 3') e B₂ (sense: 5' TGTCCTCAGCGTGTTCTTCC 3' e antisense: 5' GGTCTGAACACCAACATGG 3').

4.3. Dietas

Camundongos machos de doze semanas de idade foram individualizados e colocados em dietas comerciais (Research Diets Inc.) padrão (10 % das kCal provenientes de lipídeos) ou hiperlipídica (45 % das kCal provenientes de lipídeos) por doze semanas. Durante a dieta, o peso corporal e a ingestão de alimentos foram monitorados semanalmente. Ao final da dieta os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e então sacrificados por decapitação (sempre no período vespertino) para coleta de sangue e tecidos. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para extração de proteína e RNA. O

sangue foi centrifugado a 1000 x g por 15 minutos e o soro coletado para dosagens feitas por ELISA.

4.4. Teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Para o teste de tolerância à glicose, camundongos foram mantidos em jejum por 8 horas antes do início do experimento. Um pequeno pedaço da parte distal da cauda foi cortado e uma gota de sangue retirada para determinação da glicemia por meio do glucômetro *Advantage II* (Roche). Logo após, uma injeção intraperitoneal de 1 g de glicose por kg de animal foi administrada intraperitonealmente (i.p.) e, repetindo o procedimento anterior, a glicemia foi determinada após 15, 30, 60 e 120 minutos. No teste de sensibilidade à insulina foi administrada 0,01 U de insulina por kg de animal i.p..

4.5. Dosagens bioquímicas

Após o sacrifício por decapitação, o sangue dos animais foi coletado (sempre no período vespertino) e então centrifugado por 15 minutos a 1000 x g em temperatura ambiente. Após este processo, o soro foi utilizado para as dosagens de leptina, IL-6, TNF-alfa e MCP-1 (R&D Systems Inc. USA); insulina (Millipore Inc. USA) e proteína C-Reativa (Icclab Inc. USA) pela metodologia de ELISA.

4.6. Tratamento agudo de LPS

Camundongos C57/BL6 WT e B₁B₂^{-/-} (n=4 a 6 por grupo) foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 10 mg de LPS (Sigma Inc.) por kg de animal. Após um período de 90 minutos os camundongos foram sacrificados por decapitação e os tecidos e soros coletados para posterior análise.

4.7. Extração de RNA total

Para a obtenção do RNA total de tecidos, camundongos (n=4 a 6 por grupo) foram sacrificados por decapitação e os tecidos de interesse foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram posteriormente homogeneizados em presença de TRizol[®]. Em seqüência, 200 µL de clorofórmio por mL de TRizol[®] foi adicionado; a mistura foi agitada por inversão por 15 segundos e centrifugada a 4000 X g por 15 minutos a 4^oC. Após centrifugação, a fração superior foi recolhida, misturada a 500 µL de isopropanol 99% por ml de TRizol[®], e novamente centrifugada por 20 minutos a 4^oC. O RNA precipitado foi então lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em água Milli-Q (Millipore Inc.). A concentração de RNA foi medida por espectrofotometria e sua integridade avaliada em gel de agarose 1%.

4.8. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para evitar contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas por 1 hora a 37°C com DNase I (Promega). Depois da incubação as amostras foram aquecidas a 95°C para inativação da DNase. A transcrição reversa (RT) foi realizada com 5 µg de RNA puro, 200 U de M-MLV transcriptase reversa, 5 mM de DTT, 50 ng hexâmeros randômicos, 0,5 mM de dNTPs, e 3 mM de MgCl₂. As reações foram submetidas ao protocolo: 20°C-10 min, 42 °C-45 min, 95°C-5 min e 4°C-10 min.

4.9. RT-PCR em tempo real

O sistema SYBR-Green de RT-PCR em tempo real foi usado para quantificação da expressão gênica. As PCRs SYBR-Green foram realizadas no volume final de 10 µL contendo 100 ng de cDNA, 5 µL do SYBR-Green Universal PCR Master Mix 2x e 1 µL de uma mistura contendo oligonucleotídeos *sense* e

antisense (10 μ M cada) específicos para os cDNAs de interesse. As seqüências dos *primers* foram as seguintes: β -actina sense 5' – GAA CCC TAA GGC CAA CCG TGA A – 3' e β -actina antisense 5' – GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA AC - 3'; IL-6 sense 5' – CTG CAA AGA CTT CCA TCC AGT T – 3' e antisense 5' – GAA GTA GGG AAG GCC GTG G -3' ; CRP sense 5' – GGA GAA GCT ACT CTG GTG CCT TCT – 3' e antisense 5' – CAC ACA GTA AAG GTG TTC AGT GGC T – 3'; TNF-alfa sense 5' – CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC – 3' e antisense 5' – GAT CTG AGT GTG AGG GTC TGG – 3'; MCP-1 sense 5' – AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG – 3' e antisense 5' – TCA TTG GGA TCA TCT TGC TG – 3'. As amostras foram submetidas a um protocolo padrão (50°C-2 min, 95°C-10 min, e 40 ciclos de 95°C-15s e 60°C-1 min) em que a fluorescência foi detectada ao final de cada ciclo pelo aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems Inc.). Utilizamos para a análise de expressão gênica apenas as reações de alta eficiência (>95%), o que nos permitirá usar o parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ para expressar o valor arbitrário de expressão gênica relativa para cada amostra, tomando como controle endógeno os mRNAs da β -actina.

4.10. Análise Estatística

Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando teste *t* Student não pareado de duas caudas para a comparação entre dois grupos independentes ou ANOVA seguido do teste de Bonferroni para a comparação entre múltiplos grupos. As significâncias entre as diferenças foram rejeitadas quando $P > 0,05$.

RESULTADOS

5.1. Genotipagem dos camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$

Antes do início do tratamento com a dieta controle e hiperlipídica, os camundongos C57/BL6 selvagens (WT) e os nocautes para os receptores B_1 e B_2 de cininas ($B_1B_2^{-/-}$) foram genotipados para se verificar a presença ou ausência dos mRNAs dos receptores de cininas por meio das reações de RT-PCR (figuras 4 e 5):

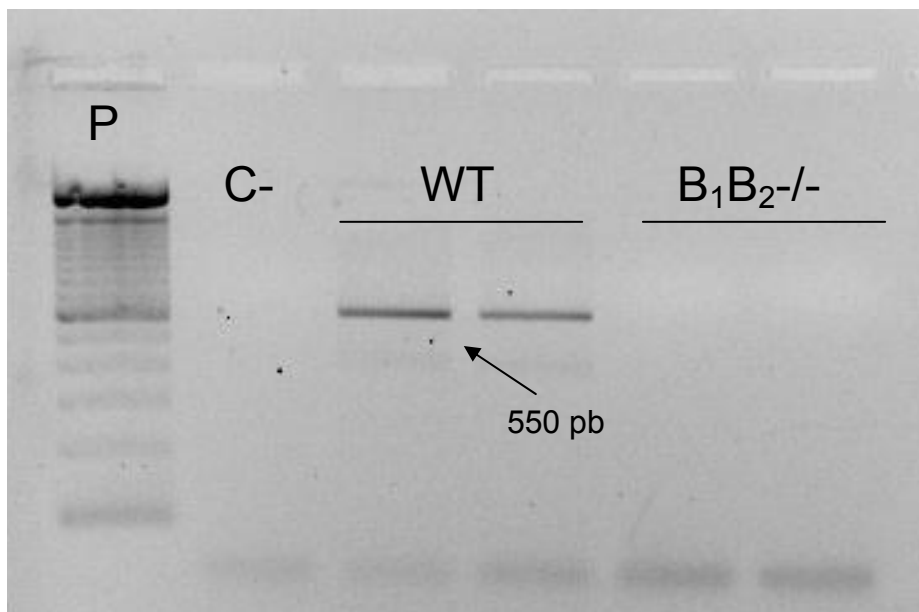


Figura 4. Representação da genotipagem de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ para o gene do receptor B_1 de cininas. P – padrão de pares de base; C- – controle negativo; WT – controle selvagem e $B_1B_2^{-/-}$ – duplo nocaute para os receptores B_1 e B_2 de cininas. A seta indica duas bandas de 550 pares de bases correspondentes ao receptor B_1 em dois camundongos WT.

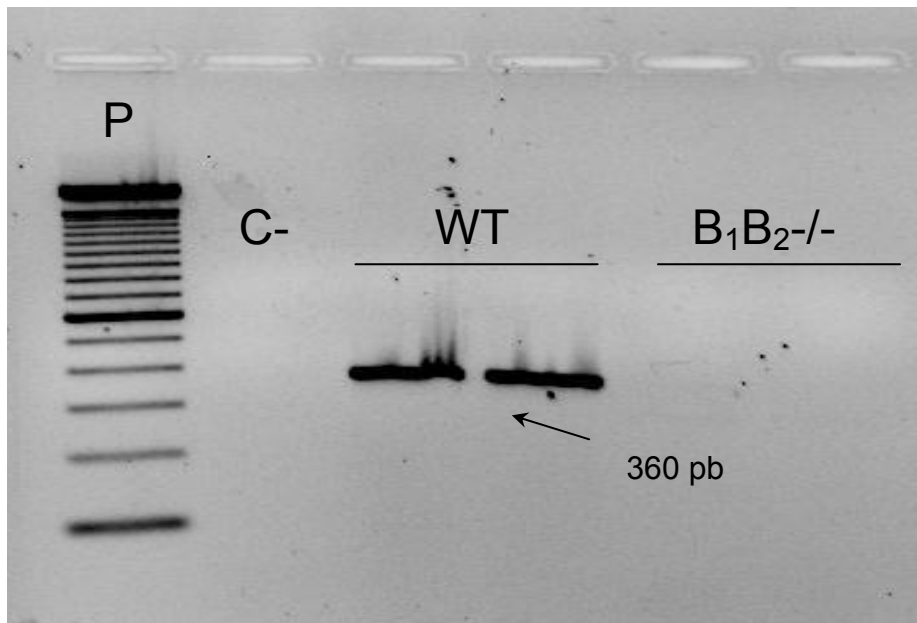


Figura 5. Representação da genotipagem de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ para o gene do receptor B_2 de cininas. P – padrão de pares de base; C- – controle negativo; WT – controle selvagem e $B_1B_2^{-/-}$ – duplo nocaute para os receptores B_1 e B_2 de cininas. A seta indica duas bandas de 360 pares de bases correspondentes ao receptor B_2 em dois camundongos WT.

Como observado na figura 4, foi detectada a presença de banda específica de 550 pb correspondente ao fragmento amplificado pelos *primers* do receptor B_1 de cininas, indicando a presença do receptor B_1 somente nos animais WT e não nos animais $B_1B_2^{-/-}$. O mesmo pode-se deduzir na figura 5, onde verificamos a presença de banda específica de 360 pb amplificada pelos *primers* do receptor B_2 , a qual é detectada somente nos animais WT.

5.2. Tratamento com as dietas controle e hiperlipídica

Definidos os genótipos dos animais WT e $B_1B_2^{-/-}$, resolvemos separá-los em grupos para iniciar o tratamento com as dietas controle e hiperlipídica. Os animais foram pesados e individualizados antes do início do tratamento e mantidos somente com a ração específica durante doze semanas. Durante o tratamento, uma vez por semana, a massa do animal e a ração consumida foram determinadas.

Para avaliar a relação do ganho de massa corporal entre os grupos pela sua dieta específica, observamos que não houve diferenças de ganho de massa entre os grupos WT e $B_1B_2^{-/-}$ em dieta controle (figura 6).

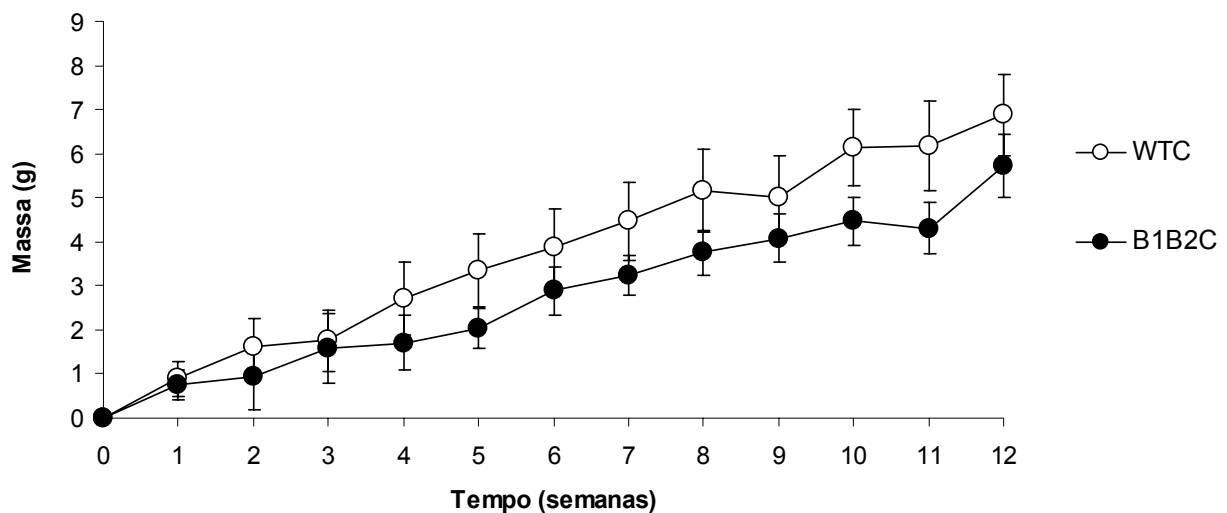


Figura 6. Ganho de massa corporal em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com dieta controle por doze semanas. WTC – selvagem e B1B2C – duplo nocaute $B_1B_2^{-/-}$.

No entanto, em relação aos grupos WT e $B_1B_2^{-/-}$ em dieta hiperlipídica, essa diferença iniciou-se a partir da 7ª semana e aumentou na 12ª semana, indicando que os camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentam o fenótipo de proteção ao ganho de massa

corporal quando comparados aos camundongos WT no momento em que ambos recebem tratamento com dieta hiperlipídica (figura 7).

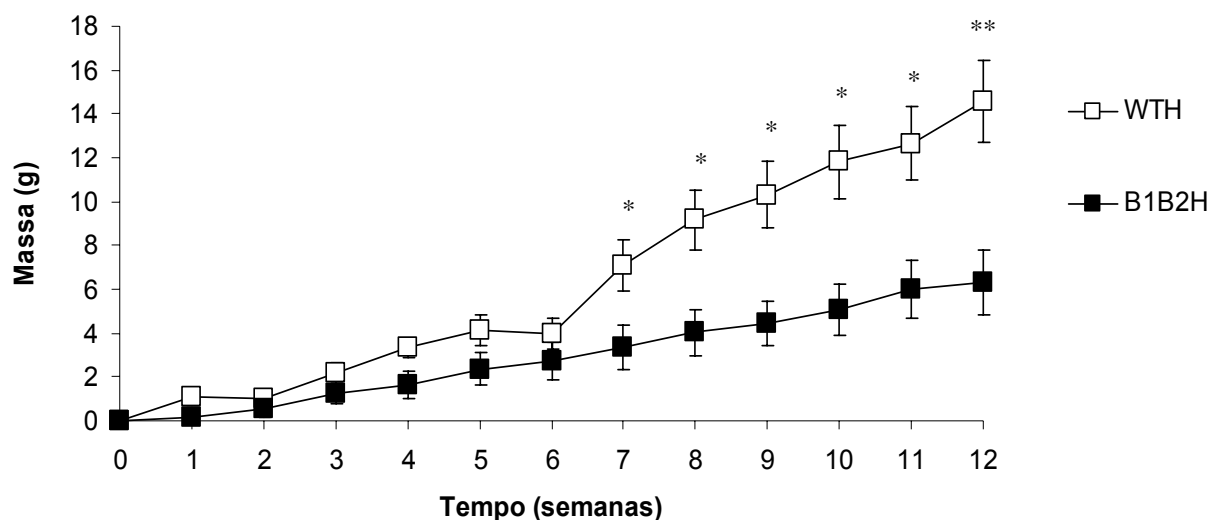


Figura 7. Ganho de massa corporal em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com dieta hiperlipídica por doze semanas. WTH – animal selvagem e B1B2H – duplo nocaute $B_1B_2^{-/-}$. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Além de verificar a massa corporal dos animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ durante o tratamento com as duas dietas, também verificamos a quantidade de calorias ingeridas por ração nesses animais, ao pesar a ração antes e após o período de uma semana.

Na figura 8 temos o gráfico de calorias ingeridas pelos camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ nas duas dietas durante as doze semanas de tratamento. Como se pode observar, os camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentaram menor ingestão calórica média quando submetidos à dieta controle. O mesmo se verifica com os camundongos tratados com dieta hiperlipídica, nos quais vemos menor consumo calórico médio nos animais $B_1B_2^{-/-}$.

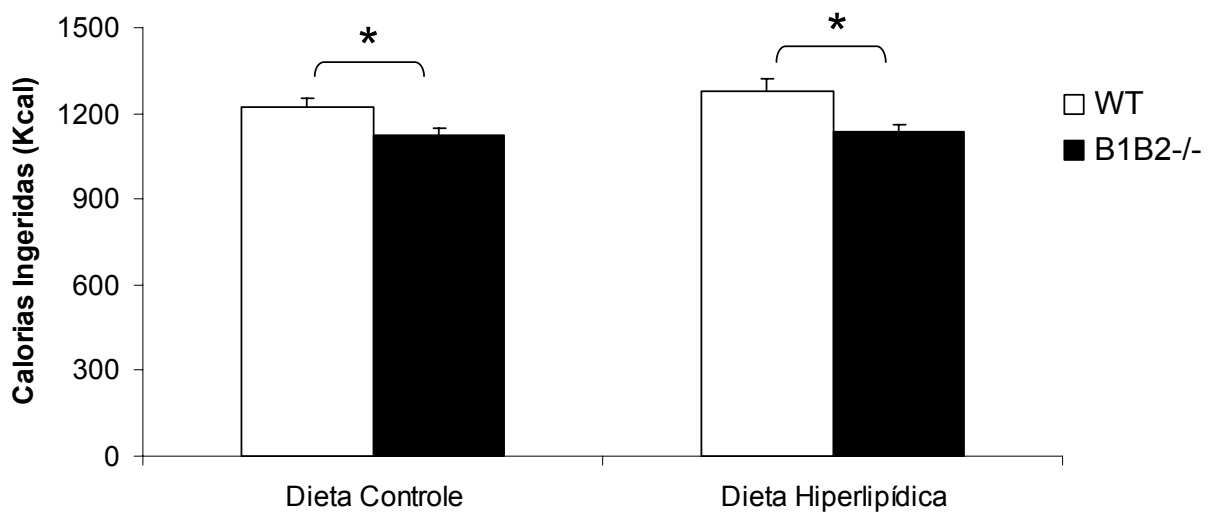


Figura 8. Calorias ingeridas por camundongos WT e B₁B₂^{-/-} durante o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas. WT – selvagem e B1B2^{-/-} – duplo nocaute B₁B₂^{-/-}. * *P* < 0,05

Ao se analisar a relação entre massa corporal ganha e calorias ingeridas, isto é, a eficiência alimentar, observamos que essa eficiência é maior no grupo WT em que há tratamento com a dieta hiperlipídica (figura 9).

Embora o grupo WT sob dieta hiperlipídica apresente significativo aumento da relação entre ganho de massa e calorias ingeridas, não foi observada nenhuma diferença entre os demais grupos. Os grupos WT e B₁B₂^{-/-} sob dieta controle apresentaram a mesma eficiência alimentar, embora os camundongos duplo nocaute apresentaram menor ingestão calórica nesta dieta. No entanto, tal fato não foi verificado no grupo sob dieta hiperlipídica, onde vemos que camundongos B₁B₂^{-/-} apresentam menor ingestão calórica e também menor eficiência alimentar em relação aos animais WT tratados com a mesma dieta.

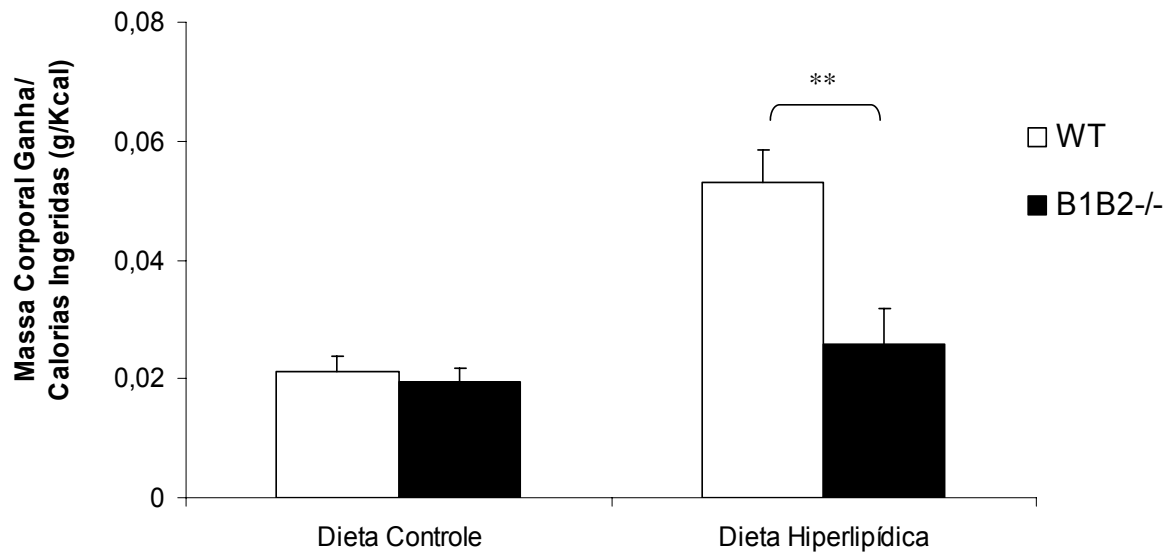


Figura 9. Eficiência alimentar em camundongos WT e B₁B₂^{-/-} durante o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas. ** $P < 0,01$.

5.3. Testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Após o tratamento dos animais com as diferentes dietas, nosso próximo passo foi analisar o mecanismo de tolerância à captação de glicose. O objetivo desse ensaio é de avaliar se as alterações de ganho de massa corporal, ingestão calórica e eficiência alimentar observadas poderiam ser decorrentes da mudança na homeostase de um dos principais hormônios reguladores do gasto energético, a insulina.

Ao final da 12^a semana de tratamento com as dietas, foi iniciado o teste de tolerância à glicose com animais WT e $B_1B_2^{-/-}$. O teste foi realizado colhendo-se amostras de sangue em cinco diferentes tempos nos quais foram detectadas diferentes valores na glicemia dos animais.

Na figura 10 vemos a concentração de glicose nos animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta controle e, como observado, não houve diferenças nos cinco diferentes pontos analisados. Tal dado coincide com o fato do grupo tratado com a dieta controle também não apresentar diferenças no aumento de massa corporal, na ingestão calórica e eficiência alimentar.

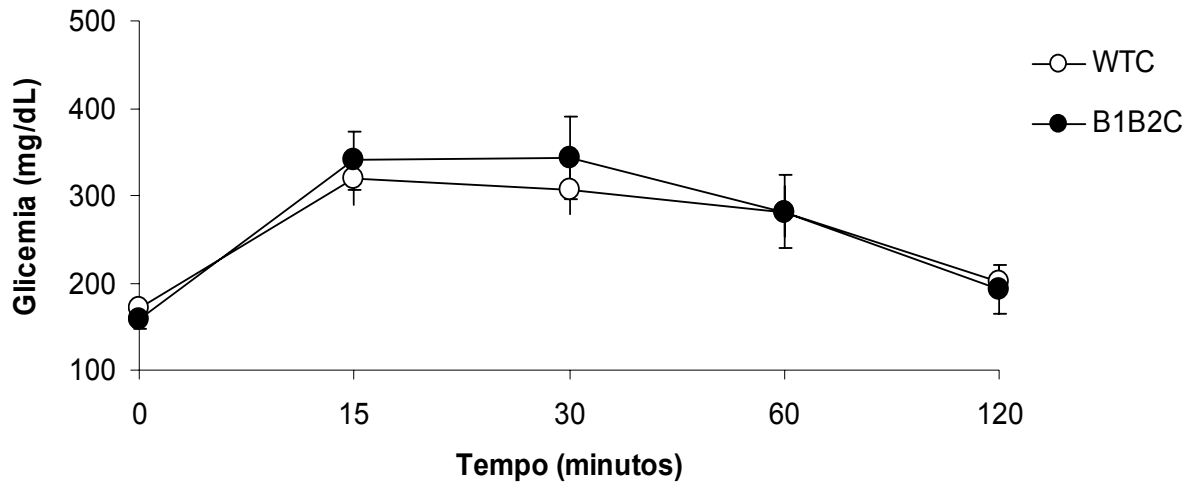


Figura 10. Teste de tolerância à glicose em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle por doze semanas. WTC – selvagem e B1B2C – duplo nocaute $B_1B_2^{-/-}$.

No entanto, essa igualdade não se mantém no grupo tratado com a dieta hiperlipídica (figura 11). Observamos que camundongos WT apresentam menor tolerância à captação de glicose circulante quando comparados aos camundongos duplo nocaute para os receptores de cininas.

Nos pontos de 30, 60 e 120 minutos os animais WT apresentaram maior glicemia quando comparados aos animais $B_1B_2^{-/-}$, sugerindo uma maior tolerância à administração exógena de glicose nos animais nocautes.

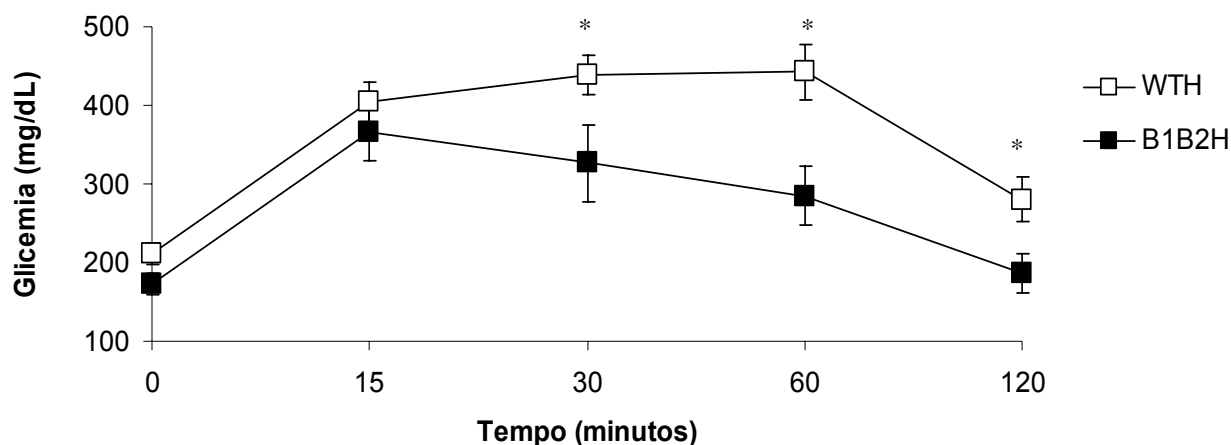


Figura 11. Teste de tolerância à glicose em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta hiperlipídica por doze semanas. WTH – selvagem e B1B2H – duplo nocaute $B_1B_2^{-/-}$. * $P < 0,05$.

Como verificado nos dados de aumento de massa corporal, ingestão calórica e eficiência alimentar, observamos também diferenças entre os grupos WT e $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta hiperlipídica, nesse caso indicando a maior tolerância dos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ à captação de glicose.

A partir disso, resolvemos analisar se tais animais poderiam também apresentar melhora na sensibilidade à insulina. Para isso, os animais foram submetidos ao teste de sensibilidade à insulina, na qual a glicemia dos animais foi determinada em quatro diferentes tempos após administração exógena de insulina intraperitonealmente.

Como visto na figura 12, não houve diferenças na glicemia dos animais tratados com a dieta controle em nenhum dos tempos analisados. Tal fato corrobora os dados observados para o teste de tolerância à glicose nos camundongos pertencentes ao mesmo grupo de dieta.

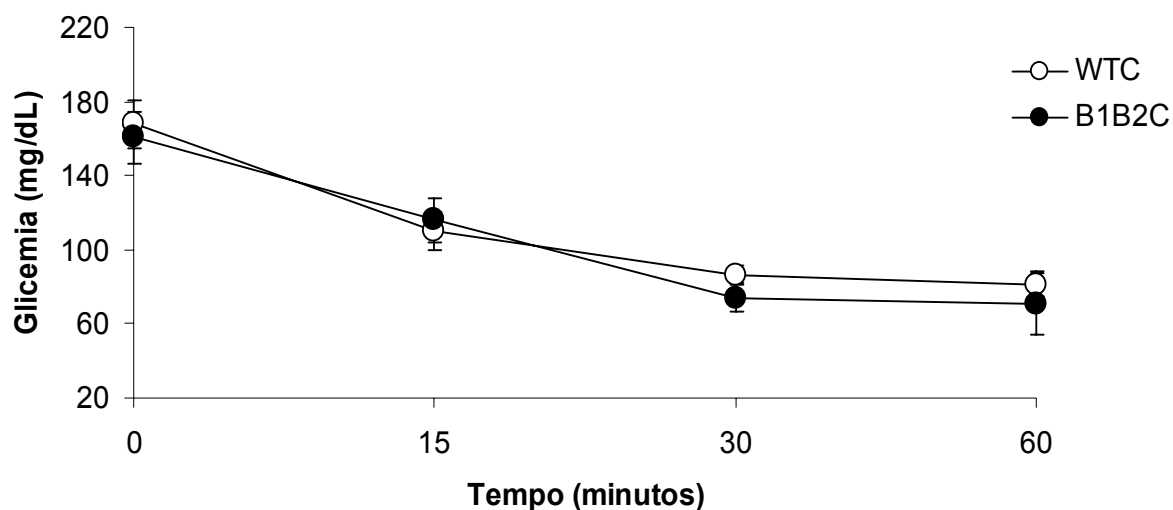


Figura 12. Teste de sensibilidade à insulina em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle por doze semanas. WTC – selvagem e B1B2C – duplo nocaute $B_1B_2^{-/-}$.

Quando se compara os animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ submetidos à dieta hiperlipídica, o teste de sensibilidade à insulina demonstra que há diferença entre os grupos (figura 13). Tal diferença é determinada apenas no ponto de 15 minutos e sugere que os camundongos duplo nocaute apresentam somente uma pequena sensibilidade à insulina exógena administrada, diferentemente do que ocorre no teste de tolerância à glicose, no qual observamos diferenças mais consistentes nos níveis glicêmicos ao longo do tempo.

O fato dos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentarem proteção ao ganho de massa corporal, menor ingestão calórica, menor eficiência alimentar, significativa melhora na tolerância à glicose e moderada sensibilidade à insulina quando submetidos à dieta hiperlipídica indica que o papel do hormônio insulina é fundamental nos resultados observados nos camundongos nocaute para os receptores de cininas.

Com base nisso, resolvemos analisar os níveis séricos deste hormônio nos animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ submetidos às dietas controle e hiperlipídica.

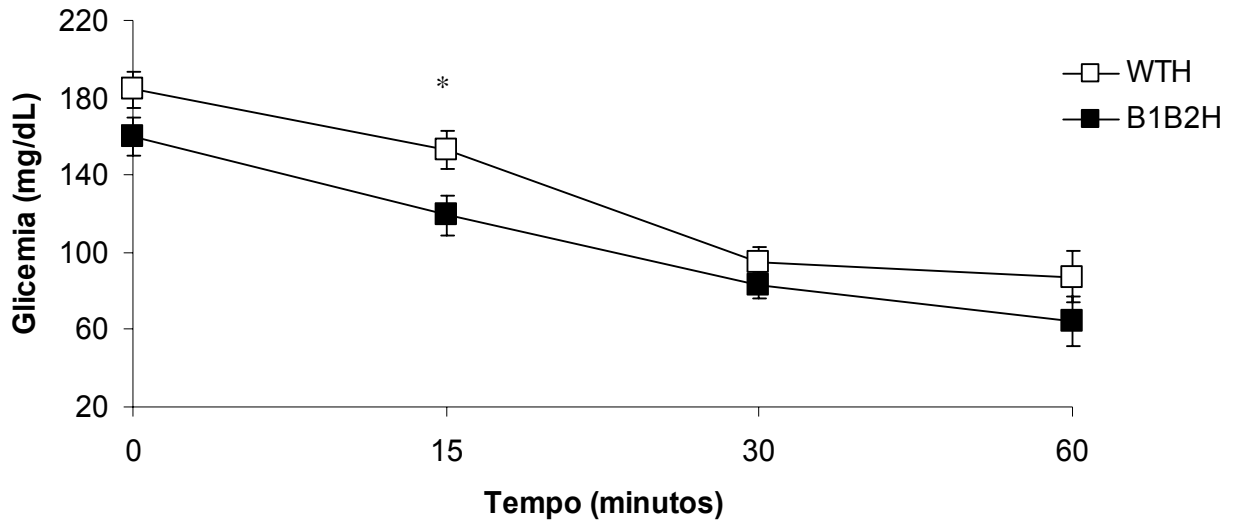


Figura 13. Teste de sensibilidade à insulina em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta hiperlipídica por doze semanas. WTH – selvagem e B1B2H – duplo nocaute $B_1B_2^{-/-}$. * $P < 0,05$.

5.4. Dosagem sérica de insulina e leptina

Após o teste de sensibilidade à insulina os animais foram eutanasiados e o soro e os tecidos foram coletados para análises posteriores. Para a determinação dos níveis circulantes de insulina no soro dos animais foi utilizada a metodologia de ELISA, sendo utilizado um kit comercial.

Na figura 14 temos os níveis séricos de insulina nos camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ tratados com dieta controle e hiperlipídica. Como se pode observar, encontramos diferenças significativas entre os grupos WT e $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta controle e hiperlipídica e verificamos também diferenças nos níveis de insulina no grupo WT nas dietas controle e hiperlipídica.

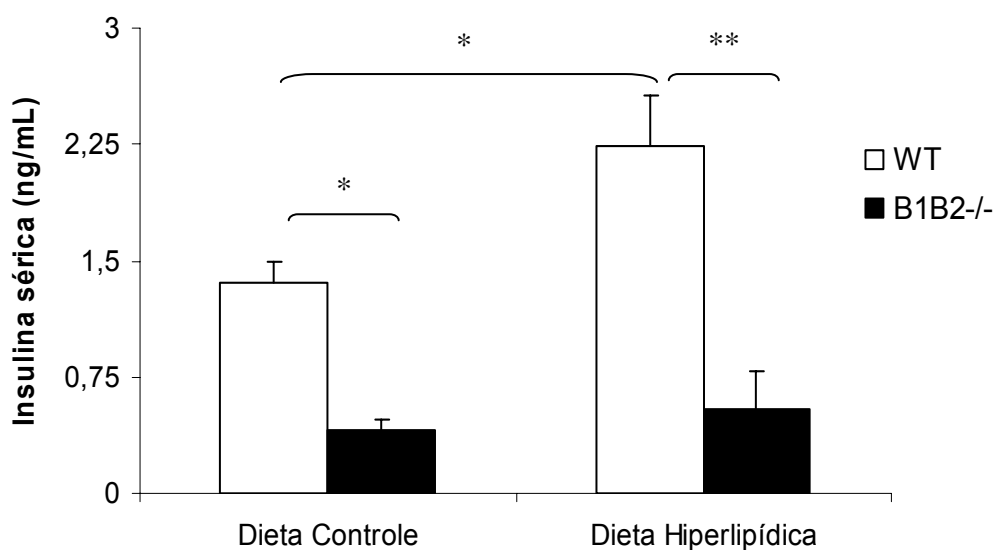


Figura 14. Dosagem sérica de insulina por ELISA em camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas.

* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Como esperado, os animais WT sob dieta hiperlipídica apresentaram maiores níveis de insulina circulantes que seus controles $B_1B_2^{-/-}$, o que corrobora a maior tolerância à glicose e moderado aumento na sensibilidade à insulina observada nos animais nocautes. No entanto, o mesmo não foi verificado nos animais do grupo sob dieta controle, ao passo que mesmo encontrando-se diferenças nos níveis insulínicos, essa diferença não é correspondida nos testes fisiológicos de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Não houve diferença significativa nos valores de insulina para os animais $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta controle e hiperlipídica (Figura 14).

Considerando-se que os camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentaram menores níveis insulínicos que os camundongos WT, tanto na dieta controle quanto na dieta hiperlipídica, também resolvemos analisar um dos principais hormônios reguladores da ingestão alimentar, a leptina.

Como observado na figura 8, os animais $B_1B_2^{-/-}$ apresentaram menor ingestão calórica nas dietas controle e hiperlipídica quando comparados aos animais WT. Dessa forma decidimos determinar os níveis de leptina no soro desses animais, um hormônio de fundamental importância para o entendimento dessa característica de comportamento alimentar. De acordo com a figura 15 podemos observar que os valores nos níveis séricos de leptina foram surpreendentemente menores nos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ tanto na dieta controle como na dieta hiperlipídica. Da mesma forma como verificado nos níveis insulínicos, os camundongos duplo nocaute para os receptores de cininas apresentaram menores concentrações de leptina no soro dos animais quando comparados aos seus controles WT. Como esperado, houve aumento do nível de leptina nos animais WT sob dieta hiperlipídica em relação aos animais WT dieta controle, no entanto, nos animais $B_1B_2^{-/-}$ esse aumento não foi observado.

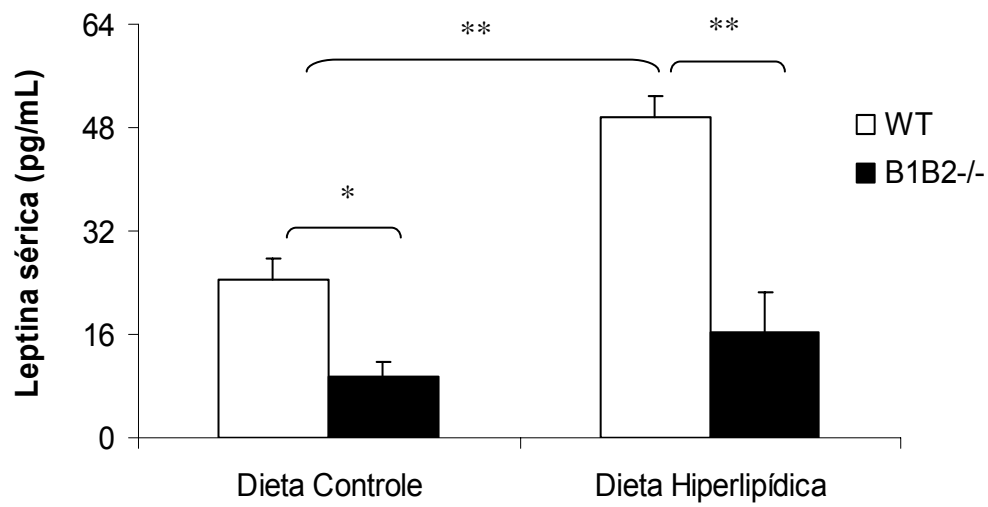


Figura 15. Dosagem sérica de leptina por ELISA em camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas.

* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

5.5. Dosagem sérica de citocinas após tratamento com as diferentes dietas

A falta do sistema caliceína-cininas funcional nos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ demonstrou que esses animais apresentam resistência ao ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica, menor ingestão calórica, menor eficiência alimentar, melhora na tolerância à glicose, relativa proteção ao desenvolvimento de resistência à insulina, níveis séricos de insulina e leptina menores que os animais WT.

Como o sistema caliceína-cininas é um participante clássico na resposta imune por meio da ativação dos receptores B_1 e B_2 , decidimos analisar as citocinas TNF-alfa, IL-6, MCP-1 e proteína C-reativa no soro dos animais após o tratamento com as dietas controle e hiperlipídica. Diversos trabalhos na literatura correlacionam a participação de tais citocinas não somente na regulação e ativação do sistema imune mas também na participação de processos que determinam a homeostase do metabolismo energético.

Nas figuras 16a e 16b podemos analisar os valores séricos de proteína C-reativa e MCP-1 nos camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ nas dietas controle e hiperlipídica. Observa-se que os valores não apresentam mudanças nos níveis das duas citocinas seja na dieta controle ou hiperlipídica para os dois diferentes genótipos.

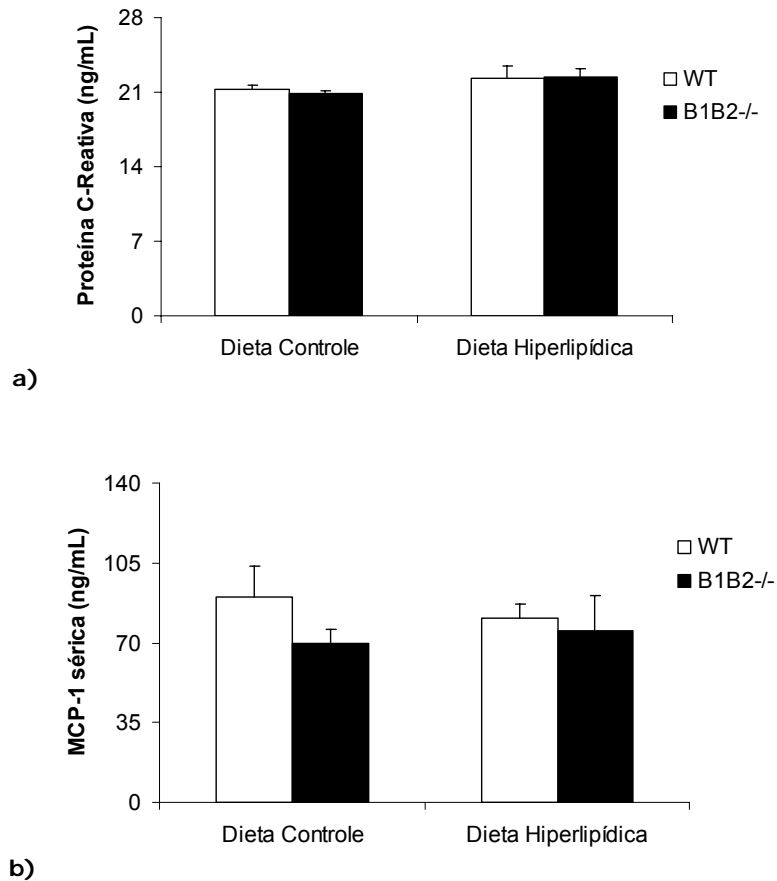


Figura 16a e 16b. Dosagem sérica de proteína C-reativa e MCP-1 por ELISA em camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas.

Não foi possível a detecção de TNF-alfa e IL-6 no soro desses animais após o tratamento com as diferentes dietas. Tal fato, provavelmente, deve-se à baixa sensibilidade do kit comercial utilizado e das pequenas concentrações encontradas dessas duas citocinas no soro dos animais.

5.6. Análise de expressão gênica após tratamento com as diferentes dietas

Embora não tenha sido possível determinar diferenças nos níveis de citocinas MCP-1 e proteína C-reativa e nem detectar níveis circulantes de TNF-alfa e IL-6 no soro dos animais testados, não podemos descartar a importância dessas citocinas na homeostase energética em camundongos $B_1B_2^{-/-}$. Com base nisso, resolvemos analisar a participação local dessas citocinas em órgãos determinantes no controle energético, como o tecido adiposo, músculo esquelético (gastrocnêmio) e fígado.

Para isso, os tecidos coletados posteriormente ao tratamento com as dietas foram devidamente preparados para a obtenção do RNA total e analisados para a expressão quantitativa do mRNA tecidual dos vários genes por meio da PCR em tempo real.

Como se pode observar na figura 17, os níveis de expressão gênica de TNF-alfa foram maiores nos camundongos WT em relação aos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ no tecido adiposo quando submetidos à dieta hiperlipídica. Além disso, os animais WT sob dieta hiperlipídica também apresentaram maiores níveis de TNF-alfa que os animais WT dieta controle nesse tecido. No entanto, tal diferença não foi observada entre os camundongos duplo nocaute e os camundongos WT no grupo dieta controle.

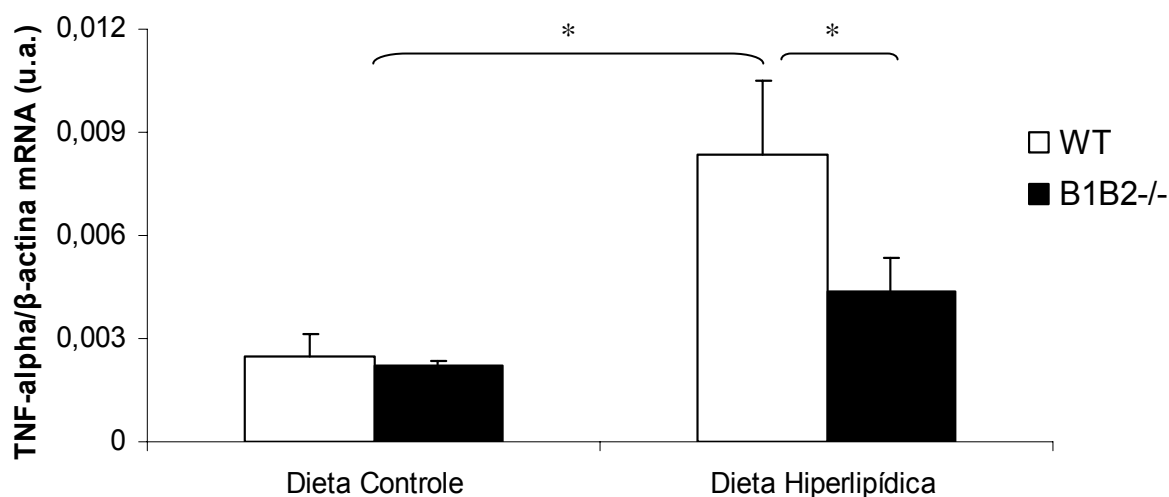


Figura 17. Expressão gênica de TNF- α em tecido adiposo de camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas.

* $P < 0,05$; u.a. = unidades arbitrárias.

O fato do tratamento com a dieta hiperlipídica ter influenciado a expressão gênica de TNF- α está de acordo com a hipótese dessa citocina estar relacionada ao aumento de massa corporal observada nos camundongos WT dieta hiperlipídica. Interessantemente, os camundongos B₁B₂^{-/-} submetidos à mesma dieta não sofreram nenhuma alteração na expressão desse gene quando comparados aos camundongos WT e B₁B₂^{-/-} tratados com a dieta controle.

Além disso, no músculo esquelético também verificamos esse mesmo padrão de expressão de TNF- α (Figura 18). Os animais WT novamente apresentaram elevados níveis da citocina quando comparados aos animais B₁B₂^{-/-} sob dieta hiperlipídica e também aos animais WT e B₁B₂^{-/-} sob dieta controle. Com base nisso, é possível determinar que o aumento da expressão do mRNA de TNF- α apresenta uma relação direta com o aumento da massa corporal observada nos animais WT dieta hiperlipídica. É importante reafirmar que os camundongos B₁B₂^{-/-} sob dieta

hiperlipídica não apresentaram diferença na expressão de TNF-alfa no músculo esquelético quando comparados aos camundongos WT e os nocautes para os receptores de cininas na dieta controle. Tal fato demonstra a importância da presença dos receptores de cininas na expressão da citocina TNF-alfa em animais submetidos à dieta hiperlipídica.

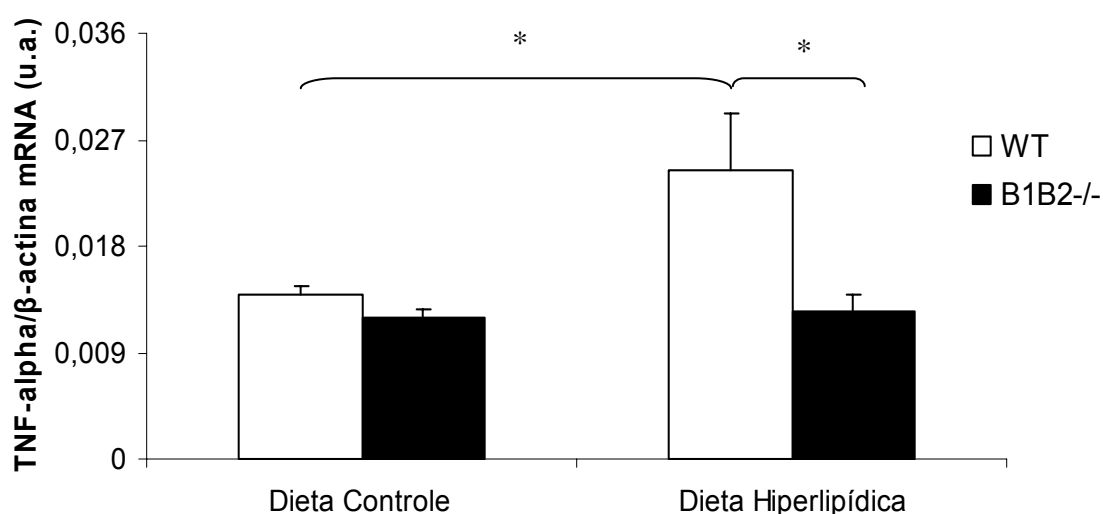


Figura 18. Expressão gênica de TNF-alfa em músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas. * $P < 0,05$; u.a.= unidades arbitrárias.

A análise do gene MCP-1 no tecido adiposo também foi verificada pela expressão de seu mRNA. Na figura 19 vemos aumento da expressão basal desse gene em camundongos B₁B₂^{-/-} submetidos à dieta controle em relação aos camundongos WT tratados com a mesma dieta. Embora exista uma tendência de aumento dos níveis de MCP-1 no tecido adiposo em camundongos B₁B₂^{-/-} com dieta hiperlipídica, devido à enorme variabilidade dos valores obtidos nos animais nocautes, não foi possível encontrar diferenças significativas.

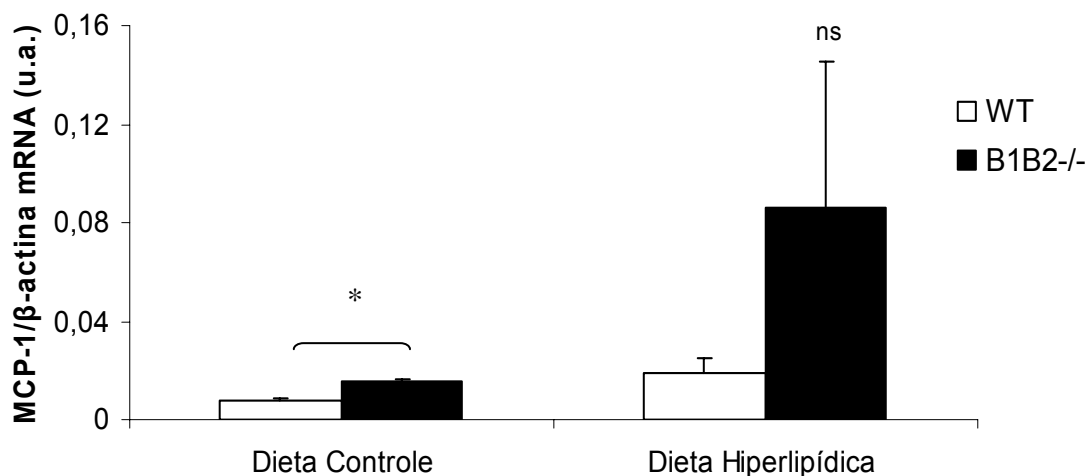


Figura 19. Expressão gênica de MCP-1 em tecido adiposo de camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas.

* $P < 0,05$, u.a.= unidades arbitrárias e ns= não significante.

Quando se analisa a expressão gênica da citocina MCP-1 no músculo esquelético (Figura 20), vemos que os camundongos duplo nocaute submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram significativo aumento de sua expressão em relação aos camundongos WT sob a mesma dieta e em relação aos camundongos WT e B₁B₂^{-/-} sob dieta controle. Além do mais, assim como evidenciado no tecido adiposo, observamos aumento da expressão de MCP-1 nos animais B₁B₂^{-/-} em relação ao seu controle WT, ambos tratados com dieta controle.

É interessante observar que no tecido adiposo existe uma tendência de aumento da expressão do gene MCP-1 no grupo de camundongos B₁B₂^{-/-} sob dieta hiperlipídica. Quando se analisa essa expressão no músculo esquelético temos que nesse mesmo grupo encontram-se diferenças significativas. Interessantemente, encontramos aumento da expressão de MCP-1 nos grupos B₁B₂^{-/-} sob dieta controle

em relação ao seu controle WT em ambos os tecidos, tanto para o músculo esquelético como para o tecido adiposo.

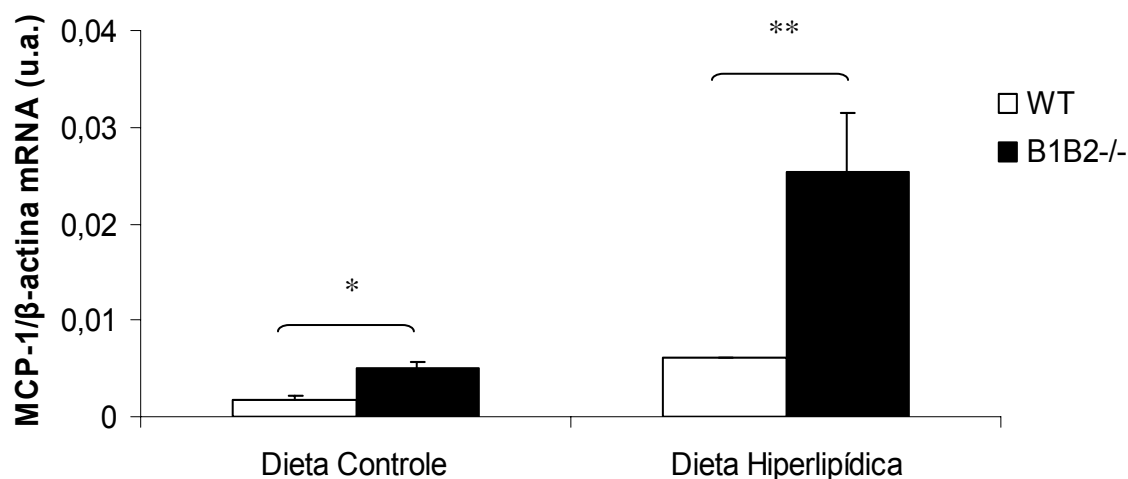


Figura 20. Expressão gênica de MCP-1 em músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. u.a.= unidades arbitrárias.

A elevada expressão de MCP-1 nos animais B₁B₂^{-/-} submetidos aos dois tipos de dietas, demonstra que tal citocina provavelmente apresenta participação distinta daquela determinada para o TNF-alfa nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. As citocinas apresentam expressões significativas em ambos os grupos embora a TNF-alfa esteja aumentada nos animais WT (em dieta hiperlipídica) e a MCP-1 esteja aumentada nos animais B₁B₂^{-/-} (tendência de aumento em dieta hiperlipídica).

Além de TNF-alfa e MCP-1 também foi analisada a expressão gênica tecidual da proteína C-reativa no fígado dos animais tratados com as dietas controle e hiperlipídica. Como mostrado na figura 21, os animais WT sob dieta hiperlipídica apresentaram um significativo aumento na expressão do mRNA da proteína C-

reativa no fígado desses animais quando comparado aos animais $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta hiperlipídica. Além disso, esse aumento na expressão gênica também foi significativamente maior em relação aos camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ submetidos à dieta controle.

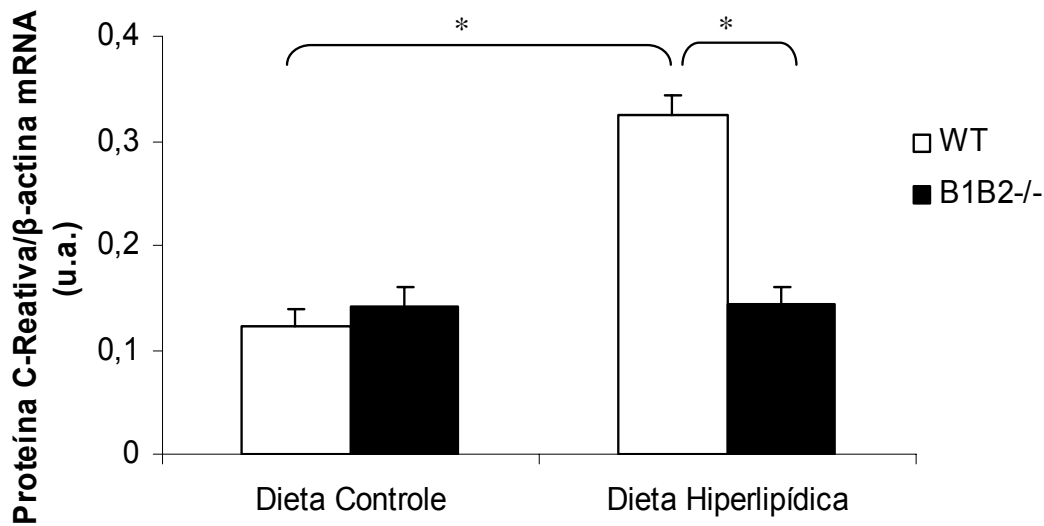


Figura 21. Expressão gênica de proteína C-reativa em fígado de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas. * $P < 0,05$. u.a.= unidades arbitrárias.

Esse dado indica o mesmo padrão de expressão observado na análise da citocina TNF-alfa no tecido adiposo e no músculo esquelético, o que sugere que essas duas proteínas podem apresentar o mesmo papel em animais WT tratados com dieta hiperlipídica (10-14). Ressalta-se que novamente os animais $B_1B_2^{-/-}$ quando tratados com dieta hiperlipídica não mudaram seu padrão de expressão da proteína C-reativa no fígado.

Por fim, a citocina IL-6 foi analisada no tecido adiposo e no músculo esquelético dos animais após o tratamento com dietas controle e hiperlipídica

(Figura 22a e 22b). Não foi observada nenhuma mudança significativa no padrão de expressão dessa citocina nos tecidos analisados. Embora exista uma tendência de aumento em alguns grupos, a diferença não foi significativa.

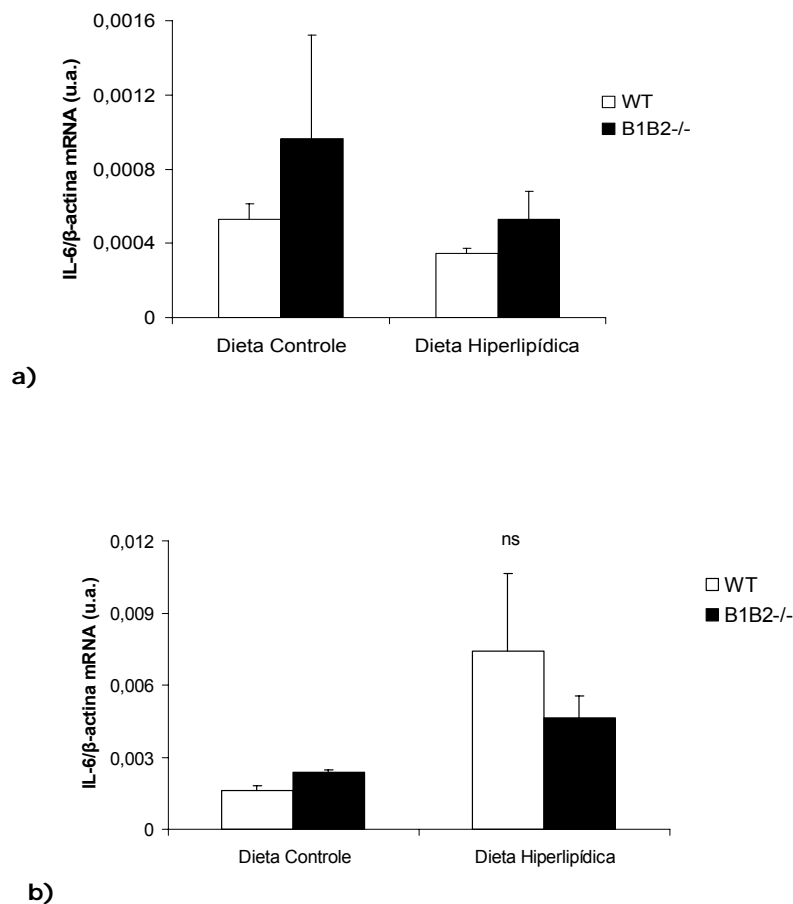


Figura 22. Expressão gênica de IL-6 em (a) tecido adiposo e (b) músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos WT e B₁B₂^{-/-} após o tratamento com dieta controle ou dieta hiperlipídica por doze semanas. u.a.= unidades arbitrárias..

DISCUSSÃO

O sistema calicreína-cininas desempenha funções estabelecidas em diversos processos biológicos como transmissão de dor, controle da pressão arterial, geração e manutenção do estado inflamatório, além de funções no trato gastrointestinal (23-25). Com o grande número de estudos realizados para o melhor entendimento de toda a complexidade desse sistema e de seu papel no corpo humano, foram sendo atribuídas mais funções a esse sistema, como seu importante papel no processo de captação de glicose (26).

O estudo dos receptores B₁ e B₂ foi fundamental para o aprofundamento do entendimento do sistema calicreína-cininas. Tais receptores apresentam diferentes funções e características, sendo o receptor B₂ constitutivamente expresso em diferentes órgãos, tecidos e células, mediando diversas ações fisiológicas determinadas pelas cininas e sendo importante principalmente na resposta inflamatória aguda (36, 50, 52). Pelo contrário, o receptor B₁ é pouco expresso em condições fisiológicas, no entanto é fortemente induzido em condições inflamatórias em diversos tecidos (36).

Com o desenvolvimento do camundongo nocaute para o receptor B₁ (camundongo B₁^{-/-}), nosso grupo demonstrou que a forte hipotensão, característica do choque endotóxico, não ocorre nesses animais após administração de LPS (53). Outros estudos mostraram que os animais B₁^{-/-} também foram protegidos contra dor neuropática e hiperalgesia induzida pelo adjuvante inflamatório de Freund (42,43). Além disso, a ausência do receptor B₁ foi capaz de reduzir o processo de migração e apoptose de neutrófilos em camundongos (53).

Recentemente, nosso grupo demonstrou a participação do receptor B₁ de cininas na modulação endócrina desempenhada pelo pâncreas. Observamos que camundongos B₁^{-/-} apresentavam baixos níveis de insulina sérica e que esta característica era resultado de um menor fluxo sanguíneo pancreático, o que

prejudicava a liberação de insulina frente a um estímulo hiperglicêmico (45). Com isso se sugeriu, pela primeira vez, a participação do receptor B₁ em processos metabólicos, em particular na homeostase glicêmica.

A evidência de que o sistema calicreína-cininas participa ativamente de processos metabólicos foi novamente determinada quando Mori e colaboradores demonstraram que camundongos B₁^{-/-} apresentavam o fenótipo de proteção contra obesidade e intolerância à glicose mediante o tratamento com dieta hiperlipídica (DHL) em relação ao grupo controle (46). Essa proteção foi devida a uma série de fatores, desde sua baixa adiposidade até a inibição da ingestão alimentar e da lipogênese pós-prandial em DHL. Esses últimos fatores, por sua vez, seriam reflexos do aumento da sensibilidade à leptina nesses camundongos, resultado dos baixos níveis séricos de leptina encontrado nesses animais. Além disso, observamos que camundongos nocautes para o receptor B₂ de cininas, também apresentam, assim como os camundongos B₁^{-/-}, resistência ao fenótipo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Reis e colaboradores, trabalho submetido).

Embora estabelecida a participação do receptor B₁ e do receptor B₂ na regulação do metabolismo energético em camundongos B₁^{-/-} e B₂^{-/-}, ainda não havíamos determinado se a ausência simultânea de ambos os receptores poderia resultar em alterações nos processos metabólicos.

No presente trabalho demonstramos, pela primeira vez, que a ausência de ambos os receptores B₁ e B₂ de cininas, ou seja, que a falta de um sistema calicreína-cininas funcional, está diretamente relacionada com o controle do aumento de massa corporal. Assim como relatado em camundongos B₁^{-/-} e B₂^{-/-}, os camundongos duplo nocaute para os receptores de cininas (B₁B₂^{-/-}) foram protegidos contra o aumento de massa corporal mediante o tratamento com dieta hiperlipídica por doze semanas.

Como podemos observar nas figuras 6 e 7, as quais demonstram o ganho de massa corporal durante o tratamento, os animais WT sob dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de massa corporal quando comparados com os animais $B_1B_2^{-/-}$ tratados com a mesma dieta. No mesmo período de tratamento (doze semanas), os animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ tratados com a dieta controle não apresentaram diferenças significativas entre suas massas corporais.

Conforme já discutido, essa não é a primeira vez que mostramos o papel do sistema caliceína-cininas no metabolismo energético (45) e sua ação na manutenção da massa corporal após o tratamento com dieta hiperlipídica (46). No entanto, essa é a primeira vez que demonstramos que a ausência de ambos os receptores pode ter um importante papel no controle da manutenção da massa corporal. Embora estudos com camundongos nocaute para ambos os receptores B_1 e B_2 tenham evidenciado proteção contra choque endotóxico por LPS (47) e proteção contra dano por isquemia/reperfusão no rim (54), ainda não havia se estabelecido qualquer alteração no metabolismo desses animais.

Evidenciada a proteção ao fenótipo de obesidade, naturalmente surgiram questões adicionais a tal fato. Por exemplo, o que poderia determinar essa característica peculiar nesses animais? Talvez os camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentassem menor ingestão alimentar? Com base nisso, resolvemos determinar a quantidade de ração/caloria ingerida pelos animais. Como os animais foram individualizados em gaiolas, foi possível determinar a ingestão calórica e a eficiência alimentar de cada animal analisado. E, como visto na figura 8, os camundongos $B_1B_2^{-/-}$, tanto tratados com dieta controle, quanto com a dieta hiperlipídica, apresentaram menor ingestão calórica média durante o período de tratamento. Além disso, os animais $B_1B_2^{-/-}$ submetidos à dieta hiperlipídica também apresentaram menor eficiência alimentar que os animais WT (Figura 9). O fato dos camundongos

duplo nocaute apresentarem menor ingestão alimentar e, conseqüentemente, menor ingestão calórica poderia explicar o fato desses animais apresentarem menor ganho de massa corporal durante o tratamento com as dietas. Embora observemos que nos animais do grupo tratado com dieta controle tenha ocorrido menor ingestão calórica nos camundongos $B_1B_2^{-/-}$, vemos que essa diferença não chegou a ser determinante no ganho de massa corporal durante o tratamento. Pelo contrário, no grupo tratado com dieta hiperlipídica, a diferença de ingestão calórica refletiu diretamente no ganho de massa. Como pode se observar na figura 8, a eficiência alimentar (que pode ser definida como a relação do ganho de massa por caloria ingerida) foi significativamente maior no grupo WT submetido à dieta hiperlipídica em relação a todos os outros grupos, inclusive em relação os animais $B_1B_2^{-/-}$.

Nosso grupo também determinou que a ingestão e a eficiência alimentar está diminuída em camundongos $B_1^{-/-}$ submetidos ao mesmo tratamento de dieta hiperlipídica que os animais $B_1B_2^{-/-}$ (46). Além disso, sugeriu-se que somente a diminuída ingestão alimentar não poderia determinar a forte resistência ao ganho de massa observada nos animais $B_1^{-/-}$. Uma questão fundamental a ser respondida nessa etapa de nosso projeto foi determinar se outros fatores, além da menor ingestão e eficiência alimentar apresentados pelos animais $B_1B_2^{-/-}$, também seriam responsáveis pelo fenótipo de proteção contra o ganho de massa corporal. Dessa forma tentamos avaliar quais seriam os mecanismos biológicos que poderiam controlar o metabolismo energético e com isso determinar se somente a menor ingestão calórica, ou outro fator, alterou o controle do balanço energético e levou à maior utilização do tecido adiposo como fonte energética e, com isso, contribuiu para a eliminação das calorias extras ingeridas. Com base nisso, decidimos determinar quais mecanismos moleculares e hormonais que, somada à menor ingestão

alimentar, foram determinantes no fenótipo de resistência à obesidade induzida pela dieta rica em gorduras.

Um dos mais importantes hormônios controladores da homeostase glicêmica, a insulina, é conhecida como um dos principais inibidores da lipólise pós-prandial, sendo liberada após as refeições e favorecendo a captação de glicose. Portanto, decidimos fazer o teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina nos camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o período de tratamento com as dietas (Figuras 10 a 13). Tal procedimento está baseado no fato de que, quanto mais sensível à insulina um indivíduo for, menor será a quantidade necessária para produzir seu efeito e, conseqüentemente, menor será seu nível circulante no soro. Com base nisso, os menores níveis circulantes de insulina poderiam levar os animais $B_1B_2^{-/-}$ a aumentar o processo de lipólise, resultando no maior uso do tecido adiposo como fonte energética e, conseqüentemente, redução de seu volume no animal.

Como visto na figura 10, não houve diferença entre a captação de glicose entre os animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ submetidos à dieta controle. Pelo contrário, quando tratados com dieta hiperlipídica (Figura 11), os mesmos animais apresentaram grandes divergências em três pontos (30, 60 e 120 minutos). Esse dado indica que, quando se administra glicose intraperitonealmente (i.p.), os camundongos $B_1B_2^{-/-}$, embora tratados com dieta rica em gordura por doze semanas, são capazes de captar essa glicose de forma muito mais eficiente que os animais WT. Esse resultado sugere que tais animais podem apresentar maior eficiência na captação de glicose mediante a ação de sua insulina circulante, o que sugere proteção ao desenvolvimento de intolerância à glicose. Em vista disso, foi administrada insulina i.p. a fim de se determinar o efeito da sensibilidade à insulina nesses animais (Figura 12 e 13).

Como observado em relação à tolerância à glicose, os animais WT e $B_1B_2^{-/-}$, sob dieta controle, também não apresentaram alterações no teste de sensibilidade à insulina (Figura 12). No entanto, como podemos ver na figura 13, houve uma pequena alteração no ponto de 15 minutos, o que sugere que os animais $B_1B_2^{-/-}$ tratados com dieta hiperlipídica podem apresentar relativa proteção contra o desenvolvimento de resistência à insulina quando comparados com os WT submetidos à mesma dieta (Figura 13).

Embora observada proteção à intolerância à glicose e parcial proteção à resistência à insulina, decidimos realizar outro experimento para reafirmar a hipótese de aumento da lipólise decorrente do menor nível circulante de insulina. Como visto na figura 14, foi surpreendente observar que os animais $B_1B_2^{-/-}$, tanto dieta controle quanto hiperlipídica, apresentaram níveis insulínicos significativamente abaixo aos seus controles. Conforme esperado, os níveis de insulina nos camundongos WT sob dieta hiperlipídica foram maiores que os animais sob dieta controle. Além disso, é interessante notar que os níveis de insulina não foram alterados quando se comparam os animais $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta controle e hiperlipídica, o que demonstra que, mesmo quando submetidos à dieta rica em gordura, os animais $B_1B_2^{-/-}$ não obtiveram aumento dos níveis séricos de insulina. Tal dado reforça, ainda mais, a hipótese de que a deficiência de um sistema caliceína-cininas funcional altera e torna mais eficiente a ação da insulina e a ativação dos mecanismos moleculares para a captação da glicose, resultando na melhora da homeostase glicêmica. Com maior eficiência da ação da insulina, não é necessária maior produção pelo pâncreas e, com isso, tem-se menores níveis circulantes e provável aumento do processo de lipólise nos camundongos $B_1B_2^{-/-}$, como observado em outros modelos animais (46). Embora necessita-se de experimentos adicionais para comprovar essa hipótese.

Além da insulina, analisamos também os níveis circulantes de outro importante hormônio regulador do metabolismo energético, a leptina (Figura 15). Interessantemente, como visto nos níveis séricos de insulina, também observamos menores níveis de leptina nos camundongos duplo nocaute, tratados com dieta controle e hiperlipídica, quando comparados com seus respectivos controles WT. De fato, nos camundongos WT submetidos à dieta rica em gordura, foram determinados maiores níveis circulantes de leptina, devido ao maior ganho de massa corporal quando comparado com os animais WT tratados com dieta controle. Embora seja contraditório observar que os níveis de leptina estão menores nos animais $B_1B_2^{-/-}$, já que baixas concentrações desse hormônio tendem a levar ao processo hiperfágico (hormônio anorexígeno), tal fato pode ser explicado pelo mesmo raciocínio utilizado para a insulina. Embora experimentos adicionais sejam necessários para comprovar tal hipótese, provavelmente a falta dos receptores B_1 e B_2 levou à alteração dos mecanismos moleculares que favorecem o aumento da sensibilidade à leptina, resultando em menor síntese desse hormônio e reduzidos níveis séricos, como observado nos animais $B_1B_2^{-/-}$ (Figura 15). Portanto, mesmo contendo menores níveis circulantes, a leptina detectada nos animais $B_1B_2^{-/-}$ poderia apresentar eficiência suficiente para ativar sua sinalização intracelular e reproduzir seu efeito biológico funcional, como observado em outros modelos animais (46).

Embora observado o papel da insulina como possível modulador do balanço energético nos animais $B_1B_2^{-/-}$, levando-os à resistência ao ganho de massa corporal mediante dieta rica em lipídeos, não ficou evidente o porquê do aumento da efetividade da ação da insulina observada nesses animais.

Sabe-se que o sistema caliceína-cininas é um participante clássico na resposta imune por meio da ativação dos receptores B_1 e B_2 e que diversos trabalhos na literatura correlacionam a participação do sistema imune na regulação e

ativação de processos que determinam a ação da insulina na homeostase do metabolismo energético (15-17, 21 e 22). Além disso, diversas citocinas estão envolvidas nessa interação entre sistema imune e metabolismo, tais como TNF-alfa, IL-6, MCP-1 e proteína C-reativa (10-14). Visto o papel do sistema calicreína-cininas no processo inflamatório, evidenciado pelos diversos trabalhos publicados durante as últimas décadas relatando sua relação com os processos de recrutamentos de leucócitos, síntese de citocinas e ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (48-52), nossa hipótese inicial era a de que os animais $B_1B_2^{-/-}$ poderiam apresentar alterações na síntese de citocinas que poderiam modificar o padrão de ação de moléculas reguladoras do metabolismo energético como a insulina.

De fato, como já discutido, diversos trabalhos relatam a relação entre resistência à insulina e diversas citocinas envolvidas em processos inflamatórios, como TNF-alfa, IL-6, MCP-1 e proteína C-reativa (CRP) (10-14). Com base nisso, resolvemos dosar essas quatro citocinas pela metodologia do ELISA (Figura 16a e 16b).

Como observado, não foi possível a detecção de TNF-alfa e IL-6 no soro desses animais após o tratamento com as diferentes dietas. Tal fato ocorreu, provavelmente, devido à baixa sensibilidade do kit comercial utilizado e das baixas concentrações encontradas dessas duas citocinas no soro dos animais. A fim de se verificar se houve falha do kit em detectar tais proteínas, resolvemos testar a detecção de todas as citocinas no soro de camundongos WT e $B_1B_2^{-/-}$ após indução inflamatória pela injeção i.p. de LPS. Como resultado, houve um aumento significativo da síntese de todas as proteínas quando comparadas ao controle salina (dado não mostrado). De qualquer forma, foi possível detectar CRP e MCP-1 no soro de animais WT e $B_1B_2^{-/-}$ após o tratamento com as dietas controle e hiperlipídica. No

entanto, não ficou evidenciada qualquer alteração entre os diferentes animais e dietas.

Embora não tenha sido possível determinar diferenças nos níveis séricos de MCP-1 e CRP e nem detectar níveis circulantes de TNF-alfa e IL-6, resolvemos analisar a expressão gênica local de seus mRNAs em órgãos e tecidos determinantes no controle energético, como o tecido adiposo, músculo esquelético e fígado (Figuras 17 a 22). Tais órgãos e tecidos são fundamentais na manutenção do balanço energético por meio da regulação da homeostase glicêmica e utilização de recursos energéticos alternativos, como a lipólise. A ação da expressão gênica diferenciada das citocinas nos tecidos correspondentes pode alterar o modo como esses tecidos utilizam e regulam o gasto energético por meio da ação da insulina.

Interessantemente, observamos redução da expressão de TNF-alfa no tecido adiposo e músculo esquelético de camundongos $B_1B_2^{-/-}$ tratados com dieta hiperlipídica em relação aos camundongos WT submetidos à mesma dieta (Figuras 17 e 18). O TNF-alfa é uma citocina secretada principalmente por células do sistema imune e adipócitos, embora seu mRNA possa ser detectado em quantidades razoáveis em outros tecidos como músculo esquelético, sendo quase indetectável no fígado (dado não mostrado). Evidências indicam que o aumento da produção de TNF-alfa está diretamente relacionado aos mecanismos envolvidos na resistência à insulina (13-15) por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B pela via de IKK β (16).

O fato de encontrarmos baixos níveis de TNF-alfa em dois importantes tecidos reguladores do metabolismo energético, como o tecido adiposo e músculo esquelético, reforça a idéia e explica em parte o porquê dos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentarem parcial proteção contra resistência à insulina (Figura 13). A diminuída expressão de TNF-alfa certamente deve favorecer a ação da insulina em tais tecidos

e promover a captação de glicose (Figura 11), evitando qualquer aumento da síntese de insulina pelo pâncreas e mantendo os níveis séricos reduzidos.

Embora a baixa expressão de TNF-alfa nos tecidos necessite de experimentos adicionais para ser discutida e explicada, uma hipótese provável seria o comprometimento da resposta das células do sistema imune (como macrófagos), devido à ausência do sistema calicreína-cininas funcional nesses animais $B_1B_2^{-/-}$; ou ainda, pensando de forma mais simples, a reduzida expressão gênica dessa citocina seria devido simplesmente à baixa adiposidade encontrada nesses animais decorrente de sua reduzida massa corporal.

Além de TNF-alfa, analisamos a expressão de MCP-1 no tecido adiposo e músculo esquelético (Figuras 19 e 20). A citocina MCP-1 é uma proteína quimiotática para monócitos, células dendríticas e células T de memória. Assim como o TNF-alfa, a MCP-1 é uma proteína que pode ser sintetizada nos adipócitos e outros tecidos como músculo esquelético. Sua produção aumenta conforme aumenta o grau de adiposidade do indivíduo, sugerindo que a MCP-1 pode estar relacionada com o recrutamento de monócitos para o tecido adiposo (55, 56). De acordo com essa hipótese, camundongos nocaute para MCP-1 são parcialmente protegidos ao desenvolvimento de resistência à insulina e apresentam redução no recrutamento de macrófagos no tecido adiposo e na expressão de genes inflamatórios (57).

Surpreendentemente, evidenciamos aumento da expressão de MCP-1 nos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ tanto sob dieta controle quanto hiperlipídica. Analisando tal fato com base em outros trabalhos publicados envolvendo MCP-1 e obesidade, temos que esse dado é contraditório se formos analisar a ação dessa proteína como uma molécula que promove o recrutamento de monócitos, como o macrófago. O aumento da expressão de MCP-1 provavelmente deveria aumentar o recrutamento dessas

células de defesa e estimular o aumento da produção de TNF-alfa, fato exatamente oposto ao encontrado no tecido adiposo e músculo esquelético dos animais $B_1B_2^{-/-}$ (Figuras 17 e 18). Embora o aumento da expressão gênica não indique necessariamente aumento da produção da proteína, pois a mesma depende dos mecanismos de tradução para ser efetiva, temos que a expressão de MCP-1 nos tecidos em questão é um fato a ser discutido.

Embora não tenha sido observada qualquer alteração nos níveis séricos da proteína MCP-1 (Figura 16b), o aumento da expressão de seu mRNA pode ser devido a um mecanismo compensatório nos tecidos analisados decorrente da ausência dos receptores B_1 e B_2 de cininas, já que o aumento da expressão de MCP-1 é encontrada não somente nos animais $B_1B_2^{-/-}$ sob dieta hiperlipídica, mas também nos animais submetidos à dieta controle. Além disso, tal fato poderia ser explicado considerando-se que o sistema calicreína-cininas apresenta participação em processos inflamatórios que envolvem o recrutamento de células de defesa (51), e em sua ausência, ocorre o desregulamento dessa produção, como mostrado nas figuras 19 e 20. Se o aumento de sua expressão leva, ou não, ao aumento do recrutamento de monócitos, é uma pergunta a ser respondida com a realização de experimentos adicionais. O que podemos sugerir é que o aumento da expressão de MCP-1 pode ser decorrente da falta dos receptores de cininas, especificamente o B_1 , que está diretamente envolvido no processo de migração de células de defesa (44).

Outra importante proteína envolvida no processo inflamatório e obesidade é a proteína C-reativa. Essa proteína inflamatória de fase aguda, secretada principalmente pelos hepatócitos, é considerada marcadora para doenças cardiovasculares e correlaciona-se com resistência à insulina quando seu nível circulante aumenta (58-61).

A análise de expressão gênica da CRP, em fígado dos animais submetidos ao tratamento com as dietas (Figura 21), mostra redução de sua expressão nos camundongos $B_1B_2^{-/-}$ submetidos à dieta hiperlipídica quando comparados aos seus controles WT. A idéia de que os camundongos $B_1B_2^{-/-}$ apresentam parcial proteção contra o desenvolvimento de resistência à insulina induzida por dieta rica em gorduras é reforçada por esse dado. Como já observado com relação à citocina TNF-alfa no tecido adiposo e músculo esquelético, a CRP apresenta redução de sua expressão gênica no fígado dos animais $B_1B_2^{-/-}$, sugerindo melhora nos mecanismos moleculares que induzem a insulina em captar mais eficientemente a glicose para o tecido, embora os níveis séricos encontrados nos animais tratados com as dietas não tenham apresentado alterações (Figura 16a). A menor ativação do complemento e do desenvolvimento do processo inflamatório nos tecidos vasculares fazem com que a menor expressão de seu mRNA nos animais $B_1B_2^{-/-}$ submetidos à dieta hiperlipídica seja outro importante fator que contribua para a parcial proteção ao desenvolvimento de resistência à insulina observada nesses animais.

Além disso, foi analisada também a expressão gênica da citocina IL-6 (Figuras 22a e 22b), a qual apresenta importante relação entre inflamação, obesidade e resistência à insulina (4-6, 20). Interessantemente, a IL-6 parece não apresentar nenhuma alteração após o tratamento com as dietas nos animais $B_1B_2^{-/-}$ e WT, embora as expressões gênicas de TNF-alfa, MCP-1 e CRP tenham apresentado alterações com o tratamento.

Em conclusão, essa é a primeira vez que a ausência de ambos os receptores B_1 e B_2 de cininas está relacionada a processos metabólicos, em particular na proteção ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. A reduzida ingestão alimentar, a resistência à intolerância à glicose, a parcial proteção ao desenvolvimento de resistência à insulina e os reduzidos níveis séricos de

insulina e leptina, após o tratamento com a dieta rica em lipídeos, foram os fatores que levaram a essa proteção contra o ganho de peso. Tais evidências resultaram na hipótese de que esses animais provavelmente desenvolvem um sustentado aumento da utilização do tecido adiposo como fonte energética, por meio do processo de lipólise e, com isso, ficam protegidos contra o ganho extra de massa corporal. Conjuntamente, as reduzidas expressões de TNF-alfa e CRP, em tecidos essenciais no controle da homeostase energética, podem favorecer a ação local da insulina e influenciar na proteção contra o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. Portanto, sugerimos que a ausência de um sistema caliceína-cininas funcional apresenta relação direta entre o metabolismo e o sistema imune, sendo uma alternativa ao tratamento de patologias como diabetes tipo 2 e obesidade.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Tópico: Obesity and Overweight. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>. Acessado dia 20 de Setembro de 2007.
2. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, Inflammation and Insulin Resistance. *Gastroenterology* **132**: 2169–2180 (2007).
3. Everson SA, Goldberg DE, Helmrich SP, Lakka TA, Lynch JW, Kaplan GA, Salonen JT. Weight gain and the risk of developing insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* **21**: 1637-1643 (1998).
4. Kahn BB & Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**: 473–481 (2000).
5. Tilg H & Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 772-783 (2006).
6. Wellen KE & Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **115**: 1111–1119 (2005).
7. Calle EE & Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Rev. Cancer* **4**: 579–591 (2004).
8. Mannino DM *et al.* Boys with high body masses have an increased risk of developing asthma: findings from the National Longitudinal Survey of Youth (NLSY). *nt. J. Obesity (Lond)* **30**: 6–13 (2006).
9. Weisberg SP *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**: 1796–1808 (2003).
10. Xu H *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**: 1821–1830 (2003).

11. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **15**: 911–919 (2005).
12. Kanda H *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **116**: 1494–1505 (2006).
13. Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**: 87–91 (1993).
14. Kern PA *et al.* The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* **95**: 2111–2119 (1995).
15. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW & Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* **389**: 610–614 (1997).
16. Yuan M *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK β . *Science* **293**: 1673–1677 (2001).
17. Hirosumi J *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**: 333–336 (2002).
18. Ozcan U *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**: 457–461 (2004).
19. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S & White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* **277**: 42394–42398 (2002).
20. Croker BA *et al.* SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling *in vivo*. *Nature Immunol.* **4**: 540–545 (2003).

21. Arkan MC *et al.* IKK β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Med.* **11**: 191–198 (2005).
22. Cai D *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK β and NF- κ B. *Nature Med.* **11**: 183–190 (2005).
23. Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**: 1-5 (2000).
24. Schölkens B. Kinin in the cardiovascular system. *Immunopharmacology* **33**: 209-216 (1996).
25. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol.* **44**: 1-79 (1992).
26. Dietze G. Modulation of the action of insulin in relation to the energy state in skeletal muscle tissue: possible involvement of kinins and prostaglandins. *Mol. Cell Endocrinol.* **25**: 127-129 (1982).
27. Mceachern AE, Shelton ER, Bhaktam S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Alderich RW, Jarnagin K. Expression cloning of rat B2 bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 7724-7728 (1991).
28. Mukai H, Fitzgibbon WR, Bozema G, Margolius HS, Ploth DW. Bradykinin B2 receptor antagonist increases chloride and water absorption in rat medullary collecting duct. *Am. J. Physiol.* **271**: R352-R360 (1996).
29. Figueroa CD, Dietze G, Müller-Esterl W. Immunolocalization of Bradykinin B2 Receptors on Skeletal Muscle Cells. *Diabetes* **45**: S24-S28 (1996).
30. Wicklmayr M, Rett K, Fink E, Tschollar W, Dietze G, Mehnert H. Local liberation of kinins by working skeletal muscle tissue in man. *Horm. Metab. Res.* **20**: 535 (1988).

- 31.** Henriksen EJ, Jacob S, Fogt DL, Dietze GJ. Effect of chronic bradykinin administration on insulin action in an animal model of insulin resistance. *Am. J. Physiol.* **44**: R40-R45 (1998).
- 32.** Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I, Gavras H. Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension* **38**: 1355-1360 (2001).
- 33.** Beard KM, Lu H, Ho K, Fantus IG. Bradykinin augments insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes via endothelial nitric oxide synthase-mediated inhibition of Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes* **55**: 2678-2687 (2006).
- 34.** Isami S, Kishikawa H, Araki E, Uehara M, Kaneko K, Shirotani T, Todaka M, Ura S, Motoyoshi S, Matsumoto K, Myamura N, Shichiri M. Bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase of insulin receptor tyrosine kinase in primary adipocytes: Evidence of bradykinin to stimulate insulin signalling pathway. *Diabetologia* **39**: 412-420 (1996).
- 35.** 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* **47**: 550-558 (1998).
- 36.** Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* **57**: 27-77 (2005).
- 37.** Christopher J, Velarde V, Jaffa AA. Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation. *Hypertension* **38**: 602-605 (2001).
- 38.** Bascands JL, Pecher C, Rouaud S, Emond C, Tack JL, Bastie MJ, Burch R, Regoli D, Girolami JP. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **264**: F548-F556 (1993).

- 39.** Smith JA, Webb C, Holford J, Burgess GM. Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **47**: 525-534 (1995).
- 40.** Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **50**: 128-139 (1996).
- 41.** Blaukat A, Herzer K, Schrieder C, Bachmann M, Nash N, Muller-Esterl W. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry* **38**: 1300-1309 (1999).
- 42.** Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* **25**: 2405-2412 (2005).
- 43.** Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, Calixto JB. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* **41**: 1006-1012 (2001).
- 44.** Araujo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, Bader M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor deficient mice. *Biol. Chem.* **382**: 91-95 (2001).
- 45.** Araujo RC, Mori MA, Merino VF, Bascands JL, Schanstra JP, Zollner RL, Villela CA, Nakaie CR, Paiva, AC, Pesquero JL, Bader M, Pesquero JB. Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biol Chem.* **387**: 431-436 (2006).
- 46.** Mori MA, Pesquero JB et al. Kinin B1 Receptor Deficiency Leads to Leptin Hypersensitivity and Resistance to Obesity. *Diabetes* **57**: 1491-1500 (2008).

-
- 47.** Cayla C, Todiras M, Iliescu R, Saul VV, Gross V, Pilz B, Chai G, Merino VF, Pesquero JB, Baltatu OC, Bader M. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *The FASEB Journal* **21** 1689-1698 (2007).
- 48.** Ghosh S, Hayden MS: New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008, **8**: 837-848.
- 49.** Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL: The B1-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 1998, **101**: 2080-2091.
- 50.** Ahluwalia A, Perretti M: Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J Immunol* 1996, **156**: 269-274.
- 51.** Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, Perretti M, Ahluwalia A: A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J Immunol* 2007, **179**: 4849-4856.
- 52.** Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A: Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol* 2002, **2**: 1729-1739.
- 53.** Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB et al.: Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**: 8140-8145.
- 54.** Masao K, Robert WM, Hyung-Suk K, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**: 7576-7581.
-

- 55.** Sartipy P and Loskutoff DJ. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 7265–7270.
- 56.** Weisberg SP et al. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**: 1796–1808. doi:10.1172/JCI200319246.
- 57.** Weisberg SP et al. 2006. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* **116**: 115–124. doi:10.1172/JCI24335.
- 58.** Festa A, Williams K, Tracy RP, Wagenknecht LE, Haffner SM. Progression of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen levels in relation to incident type 2 diabetes. *Circulation* 2006; **113**: 1753–1759.
- 59.** Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003; **166**: 387–394.
- 60.** Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**: 1416–1420.
- 61.** Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* 2002; **45**: 805–812.

