RAFAELA FADONI ALPONTI VENDRAME

**Localização e tráfego subcelular de aminopeptidases em
adipócitos de ratos obesos e privados de alimento.**

*Subcellular localization and trafficking of aminopeptidases
in adipocytes of obese and food deprived rats.*

Versão Corrigida da Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de Fisiologia Geral. Versão original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira

São Paulo

2013

RAFAELA FADONI ALPONTI VENDRAME

**Localização e tráfego subcelular de aminopeptidases em
adipócitos de ratos obesos e privados de alimento.**

*Subcellular localization and trafficking of aminopeptidases
in adipocytes of obese and food
deprived rats.*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências,
na área de Fisiologia Geral
Orientador: Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Vendrame, Rafaela Fadoni Alponi

Localização e tráfego subcelular de aminopeptidases em adipócitos de ratos obesos e privados de alimento/ Rafaela Fadoni Alponi Vendrame; orientador Paulo Flávio Silveira.

São Paulo, 2013.

115 f.

Tese (Doutorado) –

Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Peptidases 2. Obesidade 3. Adipócito

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Paulo Flávio Silveira
Orientador(a)

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a todos que acreditam em mim,
meus pais Ademir e Terezinha, meu marido Antonio,
minha filha Alice, minha irmã Letícia,
meu orientador Prof. Dr. Paulo,
meus amigos e minha família.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir que eu alcançasse mais esse objetivo, me dando força e sendo meu porto seguro nos momentos de dúvidas.

A meus pais **Ademir Alporti** e **Maria Terezinha Fadoni Alporti**, por sempre acreditarem e apoiarem todas as decisões que eu tomei em relação a minha carreira. Sempre me incentivaram e NUNCA questionaram minha escolha, nem quando eu deles dependia financeiramente. Mãe, obrigada por todas as vezes que deixou sua “vida” para vir cuidar da minha pequena enquanto eu trabalhava, por todas as conversas e orações. Pai, obrigada por nunca se incomodar em ter que ficar sozinho quando a mãe vinha para a minha casa, obrigada também por todas as orações e pelo carinho desmedido que sempre me deu. Amo vocês!

Ao amor da minha vida, **Antonio Vendrame Filho**, pela paciência, amor, carinho, puxões de orelha, pela confiança total e absoluta, pela admiração e pela sua imensa generosidade. Você sempre me incentivou a ganhar o mundo, a me realizar profissionalmente, a correr atrás dos meus sonhos e sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando. Isso faz eu te admirar ainda mais e agradecer a Deus todos os dias por ter você na minha vida, por te amar tanto e por me sentir amada!

À minha princesa **Alice Alporti Vendrame**, por tornar meus dias mais divertidos e cheios de graça, por ser tão companheira e por me ajudar na “organização” dos meus artigos quando eu espalhava os mesmos sobre a mesa. Nunca pensei que seria tão doloroso ver a carinha dela quando dizia que a mamãe estava ocupada e que não poderia brincar naquele momento, mas eu sei e ela também saberá que trabalhar muito sempre vale a pena; e teremos muito tempo para brincar de casinha, de “tia”, para passar esmalte.

À minha irmã **Letícia Fadoni Alporti**, pelas conversas descontraídas e muito animadas, pela torcida e por ser tão carinhosa e paciente comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Paulo Flávio Silveira**, por todos esses anos de convivência (10 anos!!!), ensinamentos, conversas, risadas e muitos conselhos. Há muito tempo deixou de ser meu orientador e passou a ocupar o posto de “pai científico” e amigo querido. Uma relação tão longa que também teve momentos difíceis, mas outros, a maioria deles, de alegria e admiração. Enfim, obrigada por me ensinar muitos conceitos importantes, mas principalmente por ser um exemplo de ética e competência!

Aos meus “filhos” **Rodrigo Frezzatti** e **Mariana Trivilin Mendes**, meus companheiros, por me ajudarem tanto e divertirem MUITO meus dias.

Aos meus amigos **Leonardo Zambotti Villela** e **Simone Cristina Yamazaki**, vocês foram muito importantes no começo desse trabalho.

Ao **Eduardo Osório Frare** e **Marlos Cortez**, amigos tão recentes, mas fundamentais para o meu dia a dia, pelas conversas, risadas (sempre!!!), desabafos e troca de ideias sobre protocolos e coisas do tipo.

Às amigas da Farmacologia, **Milene Luna, Camila Castelan e Adriana Toledo Ramos**, pelas conversas sobre fraldas, birras e tudo que envolve esse mundo da maternidade. É ótimo compartilhar essa experiência com vocês, meninas!

Aos colegas da Farmacologia, **Cintia Heluany, Beatriz Viana, Thiago Oliveira, Lívia Rocha, Marina Nogueira, Karina Giannotti, Márcio Matsubara, Elbio Leiguez Junior, Ana Eduarda Zulim Carvalho, Mariana Viana, Adriana Nascimento Martins** e todos os outros pelas conversas e cafés!

Aos meus amigos que não são da área e, mesmo sem entender absolutamente nada do que faço ou digo (rs), sempre vibraram com minhas conquistas e torceram para que tudo desse certo.

Ao Prof. Dr. **Pedro Ismael da Silva Junior**, do Laboratório de Proteômica Funcional, do Centro de Toxinologia Aplicada, por me aguentar todos os dias, durante meses, no laboratório enquanto eu usava a ultracentrífuga! Às alunas **Katiê Cristina Takeuti Riciluca, Gabriela Ayroza e Soraia Nascimento**, pelas risadas e conversas durante as intermináveis centrifugações!!

À **Joana Darc Carvalho Vieira**, secretária do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pela dedicação e auxílio.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, **Maria Eliza Ferreira Duval de Paula, Ana Luiza Pereira da Silva Bettoni, Andréia de Souza, Conceição de Maria Leite Leal, Antônio de França Fontes, Jorge Aparecido Fernandes, Eleonora Maria dos Reis dos Santos, Valquíria Menezes Vaz, Renata Hagi Amaral** e todos os demais que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo auxílio financeiro que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa de doutorado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral** do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em especial ao coordenador Prof. Dr. **José Guilherme de Souza Chaui Mattos Berlinck** pela receptividade e à **Roseli Silva Santos** pela atenção, simpatia, paciência e ajuda em momentos de desespero!!!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Obesidade.....	11
1.1.1. Modelo de obesidade MSG.....	13
1.2. Privação de alimento	14
1.3. Tecido adiposo	15
1.3.1. Captação de glicose no tecido adiposo	17
1.4. Aminopeptidases	18
1.4.1. IRAP	19
1.4.2. Outras aminopeptidases	21
2. OBJETIVOS	25
3. JUSTIFICATIVAS E ESTRATÉGIAS DE ESTUDO.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Animais e tratamentos.....	29
4.2. Parâmetros biométricos.....	30
4.3. Obtenção dos adipócitos	30
4.4. Contagem dos adipócitos isolados	31
4.5. Incubação dos adipócitos com peptídeos	31
4.6. Obtenção das frações de membrana e de baixa e alta densidade microssomal do adipócito....	31
4.7. Extração do RNA.....	33
4.8. Transcrição Reversa (construção da fita de DNA complementar – cDNA).....	34
4.9. PCR quantitativo em tempo real	34
4.10. Proteína	35
4.11. Atividades peptidásicas.....	35
4.12. Análise estatística e apresentação dos resultados	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Parâmetros biométricos e avaliação morfométrica e de concentração dos adipócitos	39
5.2. Parâmetros cinéticos e otimização da quantificação das atividades peptidásicas nas frações FM, HDM e LDM de adipócitos isolados.	42
5.3. Quantificação das atividades peptidásicas	49
5.3.1. <i>Ex vivo</i> (basal).....	49
5.3.2. <i>In vitro</i>	59
5.3.2.1. Modulação das atividades peptidásicas por peptídeos.....	59
5.3.2.2. Tráfego das atividades aminopeptidásicas após estímulos com peptídeos	75
5.3. Expressão gênica.....	91

6. DISCUSSÃO	96
6.1. Parâmetros biométricos, lipócrito e diâmetro médio e concentração de adipócitos.	96
6.2. Caracterização de atividades peptidásicas nas frações de membrana e de alta e.....	97
baixa densidade microssomal de adipócitos isolados	97
6.3. Aminopeptidases.....	98
6.3.1. Quantificação da atividade catalítica basal <i>in vivo</i> e expressão gênica das aminopeptidases nas frações de membrana plasmática e de alta e baixa densidade microssomal.....	98
6.3.2. Varredura da influência, <i>in vitro</i> , de peptídeos representativos para o tráfego e modulação das atividades aminopeptidásicas do adipócito.....	99
7. CONCLUSÕES	102
8. PERSPECTIVAS.....	106
9. RESUMO.....	107
10. ABSTRACT.....	108
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

ABREVIATURAS

aa – aminoácido
 ANG – angiotensina
 APA – aminopeptidase ácida
 APB – aminopeptidase básica
 APN – aminopeptidase neutra
 APM – APN insensível à puromicina
 AVP – vasopressina
 BK – bradicinina
 BSA – albumina sérica bovina
 BW – massa corporal do animal
 C – animais saudáveis sem tratamento
 CAP – cistil aminopeptidase-ocitocinase
 CCK8 – colecistocinina
 CMD – quimiocina derivada de macrófago
 CRP – proteína C reativa
 DPPIV – dipeptidil peptidase IV
 Dm – diâmetro médio dos adipócitos
 FM – fração de membrana plasmática
 GH – hormônio do crescimento
 GHRH – hormônio liberador do hormônio do crescimento
 GIP – peptídeo inibidor gástrico
 GLP – peptídeo glucagon-símile
 HDM – alta densidade microssomal
 i-C – animais saudáveis tratados com salina (sham tratados)
 IDF – International Diabetes Federation
 IMC – índice de massa corporal
 i-MSG – animais saudáveis tratados com MSG
 IL – interleucina
 IRAP – aminopeptidase regulada pela insulina
 LAP – leucina aminopeptidase
 LDM – baixa densidade microssomal
 LHRH – hormônio liberador de hormônio luteinizante
 MetAP – metionil aminopeptidase
 MHC – complexo principal de histocompatibilidade
 MSG – glutamato monossódico
 NAL – comprimento nasoanal do animal
 NPY – neuropeptídeo Y
 OMS – Organização Mundial da Saúde
 o-MSG – animais i-MSG que desenvolveram obesidade
 OXT – ocitocina
 PAI-1 – inibidor do ativador de plasminogênio 1
 P-HDM – pellet da fração de alta densidade microssomal
 P-LDM – pellet da fração de baixa densidade microssomal
 PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto
 POP – prolil oligopeptidase
 PSA – APN sensível à puromicina
 PYY – peptídeo YY
 RAS – sistema renina-angiotensina
 sc – subcutânea
 SNC – sistema nervoso central
 SP-5 – esplenopentina
 TNF – fator de necrose tumoral
 TP-5 – timopentina

TRH – hormônio liberador de tireotrofina
TSH - tireotrofina
V – volume médio dos adipócitos

1. INTRODUÇÃO

Até 15-20 anos atrás, não se cogitava sobre a relação entre o cérebro e a obesidade. Atualmente, várias pesquisas (ALPONTI *et al.* 2011a,b,c, VAN DE SANDE-LEE & VELLOSO 2012, DONG & BRUBAKER 2012, KAIDANOVICH-BEILIN *et al.* 2012) vêm mostrando a complexidade do processo de desenvolvimento dessa doença e que, nele, o sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental. Sabe-se, por exemplo, que algumas áreas do cérebro de pacientes obesos, em especial o hipotálamo, por seu envolvimento no controle da fome e do gasto energético, apresentam padrões fisiológicos distintos de atividade enzimática de aminopeptidase neutra insensível à puromicina (APM) e dipeptidil peptidase IV (DPPIV) se comparados às de indivíduos saudáveis ou privados de alimento (ALPONTI *et al.* 2011a, b,c). A presente tese, por sua vez, propõe que a obesidade hipotalâmica e alterações decorrentes no processamento de informações que chegam a esta região cerebral, bem como a privação alimentar, podem afetar o adipócito, particularmente as aminopeptidases e sua interação com peptídeos relacionados.

1.1. Obesidade

Sobrepeso e obesidade são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2006a) como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. Em 2008, cerca de 1 bilhão e meio de pessoas maiores de 15 anos apresentavam sobrepeso, e desses, pelo menos 500 milhões estavam obesos. O desenvolvimento da obesidade, ou sobrepeso mórbido, é influenciado por diversos fatores biológicos e psicossociais, incluindo predisposição genética, disfunções endócrinas e padrões dietéticos. Desde a descoberta da leptina, uma adipocina que é o produto do gene *ob* (ZHANG *et al.* 1994), os estudos desta doença convergem para a tentativa de identificar os substratos moleculares e sinalizadores metabólicos relacionados, principalmente, com a motivação para a ingestão de alimento. Atualmente, há evidências de que as alterações nas vias endócrinas e neurais implicadas na obesidade devem ser comuns a outros estados patológicos como a bulimia, a anorexia e a caquexia (INUI & MEGUID 2003, KLEIN & WALSH 2003, ZIGMAN & ELMQUIST 2003; WCISLO *et al.* 2004, ILLMAN *et al.* 2005). A projeção da OMS para 2015 é de 2,3 bilhões de pessoas com sobrepeso e mais de 700 milhões de obesos. As consequências do desbalanço energético na obesidade englobam doenças cardiovasculares (principalmente doenças cardíacas e derrames), desordens músculo-esqueléticas (especialmente osteoartrite), alguns cânceres (endometrial, mama e cólon) e diabetes melito. Segundo a International Diabetes Federation (IDF 2005), o conjunto de fatores de risco cardiovascular, denominado de síndrome metabólica, possui

uma estreita relação com hipercolesterolemia, pré-diabetes melito, diabetes melito e obesidade visceral.

Diversos sinais provenientes do trato gastrointestinal e do SNC têm um importante papel na regulação do apetite e da ingestão alimentar e evidências sugerem que os mecanismos inibidores do apetite e da ingestão calórica são prejudicados pela obesidade (PEREIRA-LANCHETA *et al.* 2012). Indivíduos submetidos, cronicamente, a uma dieta hiperlipídica, apresentam baixa sensibilidade à colecistocinina (CCK), um hormônio anorexígeno produzido pelo jejuno e duodeno em resposta à presença de alimento no intestino (SWARTZ *et al.* 2010). O peptídeo YY (PYY), também produzido pelo intestino após a ingestão alimentar, exerce uma retroalimentação negativa, inibindo o consumo de alimento. Em indivíduos obesos, os níveis de PYY são menores que em indivíduos normais, o que torna esse mecanismo de saciedade menos eficiente (BATTERHAM *et al.* 2003). Já a grelina é um hormônio orexígeno produzido pelo estômago e pelo intestino imediatamente antes do início da refeição, retornando ao seu nível basal, em indivíduos normais, em aproximadamente 60-90 minutos após o término da refeição. Entretanto, em sujeitos obesos, os níveis de grelina se mantêm elevados mesmo após a ingestão de alimento, estimulando a fome (ENGLISH *et al.* 2002, PEREIRA-LANCHETA *et al.* 2012).

A leptina é um hormônio produzido e secretado principalmente pelo tecido adiposo, tendo um importante papel na regulação do balanço energético e da função neuroendócrina (MÜNZBERG *et al.* 2005). Após sua descoberta, esperava-se que terapias utilizando leptina exógena pudessem induzir a saciedade e a perda de peso em humanos, mas apesar desse resultado ser observado em indivíduos magros ou com baixa quantidade de gordura corporal, não é observado em roedores e humanos obesos (MÜNZBERG *et al.* 2005). Obesos possuem altos níveis plasmáticos de leptina, indicando resistência à leptina, a qual pode ser causada por danos no transporte da leptina, ou na expressão e/ou sinalização dos seus receptores no SNC, ou ainda, por danos na síntese/secreção de leptina pelos adipócitos (MÜNZBERG *et al.* 2005, PEREIRA-LANCHETA *et al.* 2012).

Além da função clássica na regulação do metabolismo da glicose, a insulina possui ações centrais no controle do balanço energético, produzindo efeitos catabólicos no hipotálamo, em contraste a seus efeitos anabólicos sobre os tecidos periféricos (VAN DE SANDE-LEE & VELLOSO 2012). Alguns indivíduos obesos apresentam resistência à insulina, ou seja, redução da capacidade em estimular a utilização de glicose devido a danos na secreção e/ou utilização deste hormônio (PEREIRA-LANCHETA *et al.* 2012). Estudos mostram que o estado inflamatório crônico de baixo grau observado na obesidade resulta na resistência à insulina em tecidos periféricos (HOTAMISLIGIL *et al.* 1993, HOTAMISLIGIL *et al.* 1994, SCHENK *et al.* 2008, VAN DE SANDE-LEE & VELLOSO 2012). Há um aumento da expressão gênica e dos níveis, locais e

sistêmicos, do fator de necrose tumoral α (TNF- α) em modelos animais de obesidade, observando-se um aumento na captação periférica da glicose em resposta à insulina, após a neutralização do mesmo (HOTAMISLIGIL *et al.* 1993). Além disso, a obesidade leva a uma inflamação do hipotálamo, causando danos nessa região (ARRUDA *et al.* 2011, CALEGARI *et al.* 2011) e afetando a integridade de algumas estruturas cerebrais envolvidas no comportamento de recompensa e alimentação (CAZETTES *et al.* 2011). O aumento da expressão de proteínas de respostas inflamatórias, como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) em animais submetidos à dieta hiperlipídica por 16 dias (DE SOUZA *et al.* 2005, VAN DE SANDE-LEE & VELLOSO 2012), vem acompanhado da ativação de proteínas quinases sensíveis à inflamação (DE SOUZA *et al.* 2005, ZHANG *et al.* 2008, UNGER *et al.* 2010, VAN DE SANDE-LEE & VELLOSO 2012), culminando na diminuição da sensibilidade à leptina e insulina (ZHANG *et al.* 2008).

Existem diversos modelos experimentais para o estudo da obesidade. Aqui se utilizou um modelo de obesidade induzida por administração central neonatal de glutamato monossódico (MSG). Esse modelo produz o que, classicamente, se definiu como obesidade hipotalâmica (BRAY *et al.* 1981, WYNNE *et al.* 2005, SCOMPARIN *et al.* 2011).

1.1.1. Modelo de obesidade MSG

A indução da obesidade pelo MSG promove, principalmente, lesões no núcleo arqueado e na eminência mediana (LEIGH *et al.* 1992, ALPONTI & SILVEIRA 2010, ALPONTI *et al.* 2011a,b,c), mimetizando danos já observados em obesos (ARRUDA *et al.* 2011, CALEGARI *et al.* 2011, CAZETTES *et al.* 2011). Após repetidas doses de MSG, iniciadas imediatamente após o nascimento, os animais tornam-se obesos na vida adulta, segundo parâmetros biométricos como o índice de Lee (NAKAGAWA *et al.* 2000, ALPONTI & SILVEIRA 2010, ALPONTI *et al.* 2011a,b,c, NARDELLI *et al.* 2011) e hipertrofia adipocítica (NEMEROFF *et al.* 1978, DOLNIKOFF *et al.* 2001, ALPONTI & SILVEIRA 2010). O índice de Lee é a razão entre a massa corporal e o comprimento nasoanal (NAKAGAWA *et al.* 2000, ALPONTI & SILVEIRA 2010, ALPONTI *et al.* 2011a,b,c, NARDELLI *et al.* 2011). A hipertrofia adipocítica pode ser reconhecida por meio da medida da massa dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal (BERNARDIS & PATTERSON 1968, MACHO *et al.* 2000). Em relação aos animais normais, aqueles que recebem esse tratamento com MSG apresentam menor crescimento e massa corporal absoluta, enquanto são maiores os depósitos de gordura e a massa corporal, relativamente ao comprimento nasoanal (KAUFHOLD *et al.* 2002, ALPONTI & SILVEIRA 2010). Mais recentemente, constatou-se que a gordura periepididimal acumulada nos animais MSG diferencia-se pela expansão em maior área e não pelo aumento de

massa (ALPONTI & SILVEIRA 2010), o que pode significar que a dedução de outros autores quanto a um possível aumento da massa de gordura periepídidimal em ratos obesos MSG (MACHO *et al.* 2000) tenha sido baseada somente no aspecto visual e na distribuição local e não em sua medida (massa) efetiva. Já a gordura retroperitoneal em animais obesos MSG apresenta um aumento de massa em relação aos controles sadios (ALPONTI & SILVEIRA 2010). O modelo experimental de obesidade induzida por MSG também é caracterizado pela ausência de hiperfagia (BUNYAN *et al.* 1976, NARDELLI *et al.* 2011) e decréscimo da secreção de GH (BLOCH *et al.* 1984, SHAPIRO *et al.* 1986), bem como por hiperinsulinemia (SCALLET & OLNEY 1986, NARDELLI *et al.* 2011), corticosteronemia e leptinemia (PERELLO *et al.* 2004). Parâmetros biométricos como massa corporal absoluta, comprimento nasoanal, índice de Lee e massa dos depósitos de gordura retroperitoneal alteram-se de forma correlacionada na obesidade induzida por MSG e na privação alimentar (ALPONTI & SILVEIRA 2010). Em função da relação dos níveis de gordura periepídidimal e retroperitoneal com a glicemia, ALPONTI & SILVEIRA (2010) sugerem a possibilidade de uma menor captação de glicose pela gordura periepídidimal, o que seria um dos fatores para a tendência ao desenvolvimento tardio do diabetes melito do tipo 2 nos animais obesos MSG.

1.2. Privação de alimento

A privação de alimento, por períodos que variam entre 24-72 h, vem sendo aplicada experimentalmente, há mais de duas décadas, para avaliar alterações de diversos fatores neuroendócrinos que interagem no balanço nutricional e energético, tendo sua eficiência amplamente comprovada, neste sentido, pelos resultados relatados em diversas publicações (CAGAMPANG *et al.* 1990, HIRSCHBERG *et al.* 1991, FRANKISH *et al.* 1993, OLCHOVSKY *et al.* 1993, SCHWARTZ *et al.* 1993, SUZUKI *et al.* 1995, PRESSE *et al.* 1996, ISHIKAWA *et al.* 1997, LOPEZ *et al.* 2000, FUJIKI *et al.* 2001, KASTIN *et al.* 2001, ZAMMARETTI *et al.* 2001, CHELIKANI *et al.* 2004, CRANE *et al.* 2007, DONATO *et al.* 2009, MATSUYAMA *et al.* 2009, ALPONTI & SILVEIRA 2010, ALPONTI *et al.* 2011a,b,c). A resposta metabólica para a total privação de alimento pode ser dividida em 3 fases: a primeira fase é um curto período de adaptação, durante o qual ocorre glicogenólise; a segunda fase é caracterizada pela preservação de proteínas, e a necessidade energética é predominantemente suprida pela oxidação lipídica (VUJOVIC *et al.* 2011, WEBER & REIDY 2012), sendo que, após 3-4 dias de jejum, é observado um aumento de 2,5 vezes na taxa lipolítica e na secreção de leptina (VUJOVIC *et al.* 2011, WEBER & REIDY 2012). A última fase é marcada pelo aumento da concentração sanguínea de uréia e corticosterona (VUJOVIC

et al. 2011). Dentre as alterações endócrinas ocorridas durante a privação alimentar estão a diminuição dos níveis de insulina e leptina, o aumento do glucagon (estímulo da gliconeogênese e da glicogenólise), do GH (estímulo da lipogênese) (SPIEGELMAN & FLIER 2001, FINN & DICE 2006) e da grelina (CAMIÑA *et al.* 2003). Sabe-se que uma das principais alterações durante a privação alimentar ocorre na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Há uma regulação negativa desse eixo, caracterizada pela diminuição da concentração plasmática de tireotrofina (TSH), um mecanismo adaptativo importante para conservação da energia durante períodos de escassez alimentar (BOELEN *et al.* 2008).

1.3. Tecido adiposo

O tecido adiposo tem relevante função endócrina e a sua distribuição, até mais que o próprio acúmulo, está relacionada com doenças de alta incidência mundial como obesidade, diabetes melito tipo 2, hipertensão arterial, arteriosclerose, dislipidemias, processos inflamatórios agudos e crônicos, entre outras (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, FEDERICO *et al.* 2010).

Esse órgão é composto essencialmente por adipócitos, mas também possui matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), terminações nervosas, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, pré-adipócitos, fibroblastos, leucócitos e macrófagos (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, GIL *et al.* 2011, CINTI 2012). Os adipócitos podem ser isolados dos demais componentes do tecido adiposo por meio de digestão com colagenase (RODBELL *et al.* 1964, LIMA *et al.* 1991). Por sua vez, os adipócitos isolados podem ser processados para obtenção de frações subcelulares de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta densidade microssomal (HDM) (MCKEEL & JARETT 1970, SIMPSON *et al.* 1983). Os microssomos são pequenas vesículas formadas a partir de fragmentos do retículo endoplasmático (RE) quando células ou tecidos são rompidos por homogeneização (ALBERTS 2004). Os microssomos rugosos (ou microssomos de alta densidade - HDM) possuem ribossomos aderidos à sua superfície externa e por isso são mais densos que os microssomos lisos; o interior do microssomo rugoso é bioquimicamente equivalente ao lúmen do RE, sendo muito útil para o estudo de processos realizados pelo RE, como a síntese de novas proteínas (ALBERTS 2004). Alguns microssomos são desprovidos de ribossomos e por isso são denominados de microssomos lisos (ou microssomos de baixa densidade - LDM). Esses microssomos, diferentemente dos microssomos rugosos, não têm uma única origem, visto que podem ser derivados de porções lisas do RE, de fragmentos vesiculados do aparelho de Golgi e dos endossomos; geralmente estão envolvidos na maturação e direcionamento de peptídeos para a FM (ALBERTS 2004).

Os mamíferos possuem dois tipos de tecido adiposo, o tecido adiposo branco (TAB), especializado no armazenamento de energia e um importante órgão endócrino envolvido no controle e na regulação do peso; e o tecido adiposo marrom (TAM), o principal tecido regulador da termogênese em resposta à ingestão alimentar e frio (GIL *et al.* 2011). Quantidades substanciais de TAM podem ser detectadas em humanos jovens e adultos, porém os tamanhos dos depósitos variam de acordo com a idade e índice de massa corporal (IMC). Estudo mostrando a correlação inversa entre a quantidade de TAM e o IMC, sugere que esse tecido seja um importante fator para a manutenção do fenótipo magro (GIL *et al.* 2011).

Os depósitos de tecido adiposo branco são classificados em subcutâneo (TAS) e visceral (localizado dentro da cavidade abdominal) (TAV) e ambos contêm subdivisões (CINTI 2005, GIL *et al.* 2011, CINTI 2012). Além das diferenças quanto à localização anatômica, o TAS e o TAV apresentam diferenças funcionais e de metabolismo que variam de região para região (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, GIL *et al.* 2011). A massa adiposa em humanos é o produto do volume e do número dos adipócitos. A hipertrofia dos adipócitos é uma característica de todos os indivíduos obesos ou com sobrepeso, enquanto que a hiperplasia parece estar correlacionada com graus mais severos de obesidade (GIL *et al.* 2011), embora ainda haja controvérsia sobre a existência da adipogênese *in vivo* (QUEIROZ *et al.* 2009).

O acúmulo de gordura visceral tem sido relacionado com danos no metabolismo da glicose, desordens lipídicas, hipertensão, além de causar aumento na secreção de adipocinas, como, por exemplo, a hipersecreção de inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), o qual está relacionado com doenças trombogênicas vasculares (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, GIL *et al.* 2011). Já o TAS responde melhor aos efeitos antilipolíticos da insulina, secreta mais adiponectina e menos citocinas inflamatórias (GIL *et al.* 2011).

O TAB sintetiza e secreta as adipocinas, entre as quais a mais conhecida é a leptina, sendo estas síntese e secreção diretamente correlacionadas com a massa do tecido adiposo. A leptina estimula a expressão de neuropeptídeos ligados a mecanismos de inibição da ingestão alimentar (pro-ópio-melanocortina – POMC e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina – CART) em neurônios anorexígenos do núcleo arqueado hipotalâmico e aumenta o gasto energético total; além disso, inibe a expressão de neuropeptídeos ligados a mecanismos de aumento da ingestão alimentar (neuropeptídeo Y - NPY e peptídeo *agouti* - AgRP) em neurônios orexígenos do mesmo núcleo. Esse hormônio também tem efeito no metabolismo lipídico, no eixo reprodutivo, no sistema imune, na pressão sanguínea e na angiogênese (MINER 2004, FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, GALIC *et al.* 2010). A resistina é outra adipocina com propriedades pró-inflamatórias, secretada por monócitos e adipócitos, a qual promove resistência à insulina por meio do aumento da gliconeogênese hepática

(FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006). O tecido adiposo também produz e secreta TNF- α e IL-6, duas citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a resistência à insulina e metabolismo de carboidratos e lipídeos (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006). A adiponectina vem sendo reconhecida como a adipocina que protege contra o desenvolvimento do diabetes melito, hipertensão, inflamação e doenças cardiovasculares (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, GIL *et al.* 2011).

As necessidades energéticas e as sinalizações neurais e hormonais correspondentes regulam processos no tecido adiposo como metabolismo (lipólise), atividade secretora (adipocinas) e também a plasticidade (proliferação, diferenciação e apoptose), os quais definirão a capacidade do indivíduo em armazenar e utilizar energia sob a forma lipídica (FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, FEDERICO *et al.* 2010). Entre esses sinalizadores e reguladores estão vários peptídeos como angiotensinas (ANG) I e II, bradicinina (BK), β -endorfina, CCK, enterostatina, hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), hormônio liberador de tireotrofina (TRH), ILs, NPY, PYY, ocitocina (OXT), peptídeos insulínótrófico dependente de glicose (ou peptídeo inibidor gástrico) (GIP) e glucagon-símiles (GLP) dos tipos 1 e 2, somatostatina, substância P, vasopressina (AVP) e fator transformador do crescimento β 1 (TGF- β 1) (MACIA *et al.* 2010).

Juntamente com o músculo, o tecido adiposo é muito importante no metabolismo da glicose e esses efeitos são mediados pela insulina. A ação da insulina sobre seus receptores, presentes nesses dois tecidos, aumenta o transporte de glicose através da membrana celular, aumenta a taxa de glicólise pelo aumento da atividade da hexoquinase e da 6-fosfofrutoquinase e estimula a síntese e diminui a taxa de hidrólise do glicogênio (DIMITRIADIS *et al.* 2011).

1.3.1. Captação de glicose no tecido adiposo

A insulina é um importante fator na regulação de diversos tecidos. Por isso, alterações na sua ação são eventos críticos no desenvolvimento de várias doenças relacionadas com a síndrome metabólica (GROSS *et al.* 2004, TESAURO & CARDILLO 2011). No tecido adiposo, a insulina favorece a lipogênese (através da regulação da transcrição de enzimas lipogênicas, entre outras ações) e captação de glicose, além de inibir a lipólise (WATSON & PESSIN 2001, DUCLUZEAU *et al.* 2002, FONSECA-ALANIZ *et al.* 2006, HOU & PESSIN 2007, ZEYDA & STULNIG 2009, WONG & SUL 2010, DIMITRIADIS *et al.* 2011). Durante o período prandial, a insulina secretada é capaz de estimular a translocação da vesícula intracelular GLUT4, isoforma do transportador de glicose presente nos adipócitos e, assim, é apresentada na membrana plasmática dos adipócitos (WATSON & PESSIN 2001, DUCLUZEAU *et al.* 2002, HOU & PESSIN 2007, ZEYDA &

STULNIG 2009, JORDENS *et al.* 2010, DIMITRIADIS *et al.* 2011). A regulação da distribuição subcelular de GLUT4 no tecido adiposo é fundamental para a manutenção da homeostasia da glicose (KELLER *et al.* 2002, JORDENS *et al.* 2010).

A ligação da insulina com seu receptor promove a fosforilação de umas das subunidades β pelo domínio tirosina quinase da subunidade β adjacente, o que resulta na ativação da atividade quinase intrínseca do substrato do receptor de insulina (IRS). A fosforilação de IRS ativa a fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K), gerando 3' fosfoinositídeos, que, por sua vez, ativam a proteína quinase dependente de fosfoinositídeos (PKD1). Sabe-se que a fosforilação de PKD1 ativa Akt, que fosforila AS160, proteína responsável pelo “sequestro” intracelular da vesícula contendo GLUT4, inibindo sua atividade GAP (“Rab-GTPase-activating protein”), convertendo a proteína Rab numa proteína ativa ligada a GTP. A Rab ativa promove o tráfego da vesícula para a membrana plasmática da célula (WATSON & PESSIN 2001, HOU & PESSIN 2007).

Outras proteínas estão colocalizadas com GLUT4 nas vesículas de estocagem, entre elas a aminopeptidase regulada por insulina, IRAP, a única aminopeptidase conhecida em adipócitos (KELLER *et al.* 1995, KELLER 2004, JORDENS *et al.* 2010) antes do presente estudo.

1.4. Aminopeptidases

Como mencionado anteriormente, o tecido adiposo sofre a ação de vários peptídeos, os quais modulam importantes processos nesse tecido. As enzimas para as quais esses peptídeos são suscetíveis podem estar envolvidas nesses processos, pois alterações cinéticas influenciam substancialmente a ação de peptídeos (SONG & HEALY 1999). Por sua vez, alguns peptídeos alteram seu próprio metabolismo ou de outros peptídeos (HUI *et al.* 1982). Ainda, alguns dos efeitos farmacológicos da administração de peptídeos podem resultar da inibição competitiva sobre enzimas de degradação (inibindo a degradação de peptídeos endógenos) mais que da interação direta com receptores (LaBELLA *et al.* 1985, BRACCI *et al.* 2003). Por outro lado, apesar da grande variedade de proteases, somente algumas poucas contribuem para a hidrólise peptídica completa até aminoácidos (aa) (KADOWAKI & KANAZAWA 2003, LONE *et al.* 2010). As exopeptidases são as principais enzimas capazes de liberar aa livres como produto final. A descoberta da IRAP (EC 3.4.11.3) (KELLER *et al.* 1995) veio trazer novas perspectivas, ainda pouco exploradas, para o estudo da relação de exo- e endopeptidases com peptídeos envolvidos no sensoramento do estado nutricional e no controle do balanço energético. Recentemente, estas perspectivas foram ampliadas pela demonstração de que os níveis de atividade APM estão correlacionados com a massa corporal, índice de Lee e massa de tecido adiposo retroperitoneal na privação de alimento, mas não na

obesidade induzida pelo MSG, enquanto os níveis de atividade DPPIV insensível à diprotina-A diminuem 33% e estão correlacionados com a massa corporal, índice de Lee e massa de tecido adiposo periepídimal em ratos com obesidade induzida por MSG e privados de alimento (ALPONTI & SILVEIRA 2010). O hipotálamo e o hipocampo têm atividade DPPIV com sensibilidades diferentes para a diprotina-A, sendo a insensível identificada como CD26 e envolvida no balanço energético, provavelmente na regulação dos níveis de NPY e β -endorfina nestas áreas do SNC (ALPONTI *et al.* 2011a). Além disso, o mapeamento da APM no hipotálamo e hipocampo (ALPONTI *et al.* 2011b) e de CD26 (no hipotálamo) (ALPONTI *et al.* 2011c) de animais submetidos à privação alimentar e/ou obesidade, mostra a regulação dessas duas proteínas nessas situações de desafio metabólico. Anteriormente, havia sido relatado que as aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), cistil (CAP), DPPIV, neutra (APN) e piroglutamil (PAP), bem como a prolil oligopeptidase (POP) nos tecidos periféricos (ZAMBOTTI-VILLELA *et al.* 2008) e no SNC (ZAMBOTTI-VILLELA *et al.* 2007a, 2007b) são alteradas no modelo de diabetes melito induzido por estreptozotocina.

1.4.1. IRAP

A IRAP é uma glicoproteína de membrana tipo 2, com massa molecular de 165 kDa e pertencente a família M1 de aminopeptidases dependentes de zinco (KELLER 2004, YE *et al.* 2007). Em adipócitos com expressão diminuída de IRAP, referida como vp165 e gp160 (MAIANU *et al.* 2001) e identificada estruturalmente com a leucil aminopeptidase LAP/CAP-ocitocinase placentária humana (ROGI *et al.* 1996, NAGAKASA *et al.* 1997, PILAR *et al.* 2006), sabe-se que há um aumento da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática no estado basal (sem estimulação por insulina), provocada por aumento da exocitose relacionada com a redistribuição parcial de GLUT4 para rápida reciclagem nos endossomos (JORDENS *et al.* 2010). Assim, a diminuição da expressão de IRAP aparentemente não interferiria na captação da glicose plasmática, visto que existe uma regulação do tráfego de GLUT4 pela proteína AS160, a qual independe de IRAP (KELLER *et al.* 2002, JORDENS *et al.* 2010). A distribuição subcelular da IRAP é diferente de outras aminopeptidases dependentes de zinco que, em geral, são expressas na superfície celular. Na IRAP o domínio citoplasmático N-terminal possui toda a informação para a localização intracelular e pelo tráfego regulado pela insulina, enquanto a porção central extracelular/intraluminal da IRAP é homóloga ao domínio catalítico das aminopeptidases dependentes de zinco, como a APA, APB e APN (KELLER 2004, ALBISTON *et al.* 2007).

Em condições basais (sem a estimulação pela insulina), 90% da IRAP localizam-se em pequenas vesículas intracelulares, principalmente na LDM; os outros 10% estão na membrana plasmática. Cinco minutos após a estimulação com insulina, a quantidade de IRAP translocada para a membrana plasmática é de 50% (KELLER 2004). A atividade LAP/CAP é conhecida por apresentar níveis elevados no plasma de primatas prenhes e por sua capacidade de hidrolisar OXT e AVP (MIZUTANI *et al.* 1995, MATSUMOTO & MORI 1998). Também, tem sido considerada como capaz de hidrolisar o hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) (KUHL *et al.* 1979). Não só a estimulação pela insulina promove a translocação da IRAP, mas também o fazem a OXT, a AVP e o exercício físico (HERBST *et al.* 1997, NAKAMURA *et al.* 2000). O receptor AT4 está identificado como uma IRAP (ALBISTON *et al.* 2010), sendo proposto que o efeito da ligação de ANG IV (3-8) com AT4 resulte, em parte, da inibição da clivagem, por essa enzima, de neuropeptídeos como a somatostatina e a AVP (LEW *et al.* 2003, AXEN *et al.* 2006, WALLIS *et al.* 2007, ANDERSSON *et al.* 2008, JORDENS *et al.* 2010). Atualmente, sabe-se que o peptídeo LVV-hemorfina-7 também é um ligante bioativo do receptor AT4 (CHAI *et al.* 2004, ALBISTON *et al.* 2010). Além da ação da ANG IV e, possivelmente da LVV-hemorfina-7, como inibidoras da atividade catalítica da IRAP, estes peptídeos também poderiam exercer seus efeitos modulando a captação de glicose via tráfego da GLUT4, ou a própria IRAP seria um receptor clássico transduzindo o sinal iniciado pela ligação destes peptídeos no seu domínio C-terminal para um domínio intracelular que interagiria com proteínas citoplasmáticas. A IRAP/AT4 no SNC é atualmente um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos para tratamento de distúrbios cognitivos, como o Alzheimer, visto que ANG IV e LVV-hemorfina-7 exercem potente efeito benéfico sobre a memória (HALLBERG 2009, ALBISTON *et al.* 2010). Recentemente, foi demonstrado que ANG II (1-8), -III (2-8), -IV e ANG (1-7) são produtos de degradação em cultura de adipócitos 3T3-L1 e que há baixos teores de ANG (3-7) nestas células (WEILAND & VERSPOHL 2009). Este mesmo trabalho relata que as concentrações de ANG III e ANG IV são modificadas, na adjacência destas células, por degradação N-terminal, a qual resulta em ANG (3-8), - (4-8) e - (5-8), e que ANG IV e ANG II são altamente efetivas em inibir a IRAP nestas células (WEILAND & VERSPOHL 2009). Foi observado ainda que ANG (1-7) é o principal produto de degradação derivado de ANG I via ANG (1-9), e que ANG II seria um dos peptídeos regulados pela IRAP (WEILAND & VERSPOHL 2009). Sabe-se, também, que as atividades catalíticas de LAP/CAP e de APN apresentam-se sobrepostas em vários tecidos (NAGASAKA *et al.* 1997, GOLDING *et al.* 2010). Por outro lado, como comentado anteriormente, o processo de obesidade tem sido caracterizado como um estado inflamatório crônico de baixo grau, principalmente devido à intensa produção de citocinas, como TNF- α , proteína C reativa (CRP), IL-1 e IL-6, a qual está

relacionada com a infiltração de macrófagos no tecido adiposo de obesos (CUSI 2010). As citocinas pró-inflamatórias produzidas no tecido adiposo podem alterar sua função endócrina e também podem estar relacionadas à resistência a insulina (JAGER *et al.* 2006, CUSI 2010). Há estudo que sugere que pré-adipócitos possam se diferenciar em macrófagos, mas os monócitos circulantes são a principal origem dos macrófagos no tecido adiposo (FANTUZZI 2005). Já é conhecido também que o aumento de atividades APB, APN, DPPIV e POP ocorre em macrófagos elicitados (OLIVO *et al.* 2005).

1.4.2. Outras aminopeptidases

A **APB** (EC 3.4.11.6) é conhecida por efetuar a remoção de resíduos arginil e lisil, especialmente de di e tripeptídeos (O'CUINN 1998, ORNING *et al.* 1994). Esta atividade está bem distribuída em vários tipos celulares (FOULON *et al.* 1999), incluindo o linfócito T humano (BELHACENE *et al.* 1993). A atividade aminopeptidásica da APB está relacionada com a atividade leucotrieno-A4-hidrolase (essencial para a conversão do leucotrieno A4, o passo final da biossíntese do leucotrieno pró-inflamatório B4), aparentemente coexistindo numa mesma molécula (FOULON *et al.* 1999, THUNNISSEN *et al.* 2001). A participação da APB tem sido observada no processamento de pró-hormônios (LOH *et al.* 1988, YASOTHORNSRIKUL *et al.* 1998) e metabolismo de ANG III para ANG IV (WRIGHT & HARDING 1995, 1997, MARTÍNEZ-MARTOS *et al.* 2011), além de estar alterada em modelo experimental de artrite reumatoide (MENDES *et al.* 2011).

A **APN** é uma metalopeptidase, dependente de zinco, que catalisa a remoção de resíduos de aa neutros (SANDERINK *et al.* 1988, SHIPP & LOOK 1993). Demonstrou-se que a APN de membrana é idêntica à CD13 (LOOK *et al.* 1989). Essa atividade é reconhecida como um marcador importante de células da linhagem mielomonocítica (ZIABER *et al.* 2000). A CD13 foi descrita em grande variedade de células de mamíferos (LOHN *et al.* 2002). Esta aminopeptidase está envolvida no processamento de peptídeos no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) dos tipos I e II (LARSEN *et al.* 1996). Pode, ainda, clivar citocinas, ativando-as ou inativando-as. Os substratos naturais conhecidos da APN/CD13 incluem a IL-8, substância P, somatostatina, ANG III, lisil-BK (calidina) e neuropeptídeos como a dinorfina e leu- e met- encefalinas (MIZUTANI *et al.* 1993, SAFAVI & HERSH 1995, PALTER *et al.* 2001, SONG & MARVIZON 2003, STRAGIER *et al.* 2007, GOLDING *et al.* 2010). A APN purificada de placenta humana hidrolisa *in vitro* vários peptídeos imunomoduladores. Entre estes, a esplenopentina (SP-5, H-Arg-Lys-Glu-Val-Tyr-OH) e a timopentina (TP-5, H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH) (ambos os peptídeos sintéticos correspondentes à

região 32-34 do hormônio polipeptídico do baço, esplenina, e do hormônio polipeptídico do timo, a timopoietina), tuftsin (peptídeo estimulador da fagocitose) e rigina (análogo da tuftsin) (KRAUS-BERTHIER *et al.* 1993, MIZUTANI *et al.* 1993, CILLIARI *et al.* 1994). No plasma (ALPONTI & SILVEIRA 2010) e no SNC (MCDERMOTT *et al.* 1985, DYER *et al.* 1990, CONSTAM *et al.* 1995, LARRINAGA *et al.* 2005, ALPONTI *et al.* 2011a,b,c) têm sido detectados dois tipos de atividades APN, sensível e insensível à puromicina. No SNC, a sensível à puromicina (APN-PS ou PSA – EC 3.4.11.14) está presente em frações solúvel e de membrana (MCDERMOTT *et al.* 1985, DYER *et al.* 1990, CONSTAM *et al.* 1995, LARRINAGA *et al.* 2005, ALPONTI *et al.* 2011b). Os neuropeptídeos substratos da PSA são os mesmos hidrolisados pela APN/CD13. No SNC, a atividade APN insensível à puromicina é predominantemente de membrana (APN-PI ou APM – EC 3.4.11.2) (GIROS *et al.* 1986, LARRINAGA *et al.* 2005, ALPONTI *et al.* 2011b), a qual apresenta identidade com CD13 (MAHONEY *et al.* 2007, ALPONTI *et al.* 2011b).

Enquanto o metabolismo de ANG III para ANG IV ocorre pela ação da APN (PRIETO *et al.* 2003, MARTÍNEZ-MARTOS *et al.* 2011) ou da APB (WRIGHT & HARDING 1995, 1997, MARTÍNEZ-MARTOS *et al.* 2011), a **APA** (EC 3.4.11.7) (angiotensinase A) hidrolisa ANG I para ANG (2-10) (PRIETO *et al.* 2003) e ANG II para ANG III (JOHNSON *et al.* 1984, MARTÍNEZ-MARTOS *et al.* 2011). A APN também degrada ANG IV, formando os fragmentos ANG II (4-8), ANG II (5-8) e ANG II (6-8) em células mesangiais de rato (CHANSEL *et al.* 1998). A APA foi relacionada também à síntese e transporte de pró-hormônios (RAMIREZ *et al.* 1990). A molécula BP-1/6C3, expressa pelas células pré-B e células B imaturas, células do timo, células endoteliais, enterócitos e células do túbulo proximal renal, apresenta atividade APA (WANG *et al.* 1996). A APA-BP-1/6C3 promove a hidrólise de um inibidor da proliferação do precursor da célula B (WELCH 1995). Sua expressão parece ser positivamente regulada por IL-7 (WANG *et al.* 1998). A expressão de mRNA e a atividade da APA aumentam em glomérulos renais de ratos diabéticos de cinco semanas; a primeira suprimida pela administração de insulina e tratamento agudo com antagonista de ANG (saralasina), enquanto a atividade enzimática é suprimida somente pela saralasina e não pela insulina (THAISS *et al.* 1996). O tecido adiposo sintetiza e secreta angiotensinogênio. O sistema renina-angiotensina (RAS) do tecido adiposo regula a expressão de fatores endócrinos, incluindo prostaciclina, óxido nítrico, PAI-1 e leptina. A ANG II promove crescimento e diferenciação dos adipócitos e indiretamente estimula a síntese de prostaglandina (KERSHAW & FLIER 2004), além de estar diretamente envolvida com a regulação da pressão arterial e com o consumo de oxigênio e de energia, reduzindo a massa corporal por mecanismos relacionados ao consumo de alimento (CASSIS *et al.* 2002). A ANG II também é capaz de estimular a lipogênese, inibir a lipólise e induzir a resistência à insulina (JONES *et al.* 1997, FONSECA-

ALANIZ *et al.* 2006, YVAN-CHARVET & QUIGNARD-BOULANGÉ 2011). A conversão de ANG II em ANG III resulta em estímulo para a liberação de AVP (ZINI *et al.* 1996). A inibição do RAS, bem como o aumento da concentração de BK, promovem um aumento no transporte de glicose e de IRAP, por meio da GLUT4, favorecendo a sensibilidade à insulina (SCHEEN 2004, KASPER *et al.* 2011). No diabetes melito tipo 2 a translocação da IRAP é prejudicada e consequentemente diminui a clivagem dos seus substratos, exacerbando a atividade destes (KELLER 2004). No tecido adiposo há receptores para a BK que, ao serem estimulados, aumentam a sensibilidade à insulina por meio de mecanismos relacionados ao óxido nítrico (BEARD *et al.* 2006). Outro substrato da APA é a CCK8, a qual participa na homeostasia da glicose (VERSPOHL *et al.* 1992). A CCK8 pode ser co-secretada com AVP e OXT para atuar em alvos periféricos e, ainda, estar envolvida na neurosecreção de AVP e OXT (BEINFELD *et al.* 1980). Decréscimos nos níveis de glicose celular estimulam a secreção neurohipofisária de AVP e OXT na circulação periférica (BRISKI *et al.* 2000). Embora AVP e OXT sejam clivados *in vitro* pela IRAP (KELLER 2004), foi relatado que ANG II e OXT não apresentam efeito na lipólise de triglicérides nos adipócitos (AXELROD *et al.* 1985, YVAN-CHARVET & QUIGNARD-BOULANGÉ 2011), enquanto AVP parece estimular a lipólise via receptor V_{1B} (HIROYAMA *et al.* 2009).

A metionil aminopeptidase 2 (EC 3.4.11.18) (**MetAP2**) é uma metalopeptidase que remove resíduos metionina da porção N-terminal de proteínas nascentes. MetAP2 inibe, de forma não enzimática, a fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2a, o qual regula positivamente a tradução. O bloqueio irreversível do sítio ativo de MetAP2 (GRIFFITH *et al.* 1998, YEH *et al.* 2000) causa a inibição do crescimento de células endoteliais, inibição da progressão do ciclo celular na fase S, causando um atraso na fase G por ativação de p53, levando ao acúmulo de p21 (LIJNEN *et al.* 2010). A fumaglina, inibidor da MetAP2, é capaz de reduzir a formação de tecido adiposo em camundongos com obesidade induzida por dieta (LIJNEN *et al.* 2010).

A **DPPIV** (EC 3.4.14.5) pertence ao grupo restrito de enzimas que especificamente reconhecem a prolina em peptídeos. Dada a sua estrutura cíclica peculiar, a prolina impõe restrições estruturais para degradação e confere propriedades biológicas particulares a peptídeos e proteínas nos quais está presente. Alguns peptídeos fundamentais no controle do balanço energético contêm prolina na porção N-terminal. A DPPIV, em suas formas solúvel e de membrana (CD26), remove dipeptídeos da porção N-terminal de peptídeos contendo Xaa-Pro ou Xaa-Ala (GILMARTIN & O'CUINN 1999, MENTLEIN 1999, ROSENBLUM & KOZARICH 2003), sendo inativa sobre Xaa-Pro-Pro ou Xaa-Pro-Hyp (MENTLEIN 1999). Dentre os peptídeos clivados *in vitro* pela DPPIV estão o GLP-1, GLP-2, GIP, PYY(1-36), endorfina-2, dinorfina, substância P, GHRH e ANG IV (MEDEIROS & TURNER 1994, CHANSEL *et al.* 1998, MENTLEIN 1999, GHERSI *et al.* 2001,

BATTERHAM *et al.* 2002, GABRILOVAC *et al.* 2003, SAKURADA *et al.* 2003, SAKURADA 2004, GALLWITZ 2011). Várias quimiocinas, citocinas e peptídeos sinalizadores também compartilham uma ligação Xaa-Pro altamente conservada na porção N-terminal (MAE *et al.* 1999). A DPPIV é a única enzima conhecida com capacidade para clivar, em pH neutro, este N-terminal Xaa-Pro de quimiocinas como a CCL5 (RANTES), fator-1 derivado de estroma e quimiocina derivada de macrófago (CMD) (MANTOVANI *et al.* 2000). A forma membranal (CD26) da DPPIV é também conhecida por participar da ativação de células T, ligando adenosina desaminase à superfície destas células e, então, protegendo-as da inibição de sua proliferação (PETHIYAGODA *et al.* 2000, GORRELL *et al.* 2001). O receptor Y, que possui afinidade por substratos da DPPIV (peptídeos NPY e PYY), foi identificado em adipócitos, mediando efeito anti-lipolítico e ação positiva na secreção de leptina (SERRADEIL-LE *et al.* 2000). Apesar de ser intensamente estudada em vários outros sistemas há mais de uma década (HILDEBRANDT *et al.* 2000), ainda hoje são escassas as informações sobre a atividade DPPIV no SNC (SMYTH & O'CUINN 1994, FRERKER *et al.* 2007), mas sabe-se que há dois tipos de atividades DPPIV no hipotálamo e no hipocampo (ALPONTI *et al.* 2011a), também presentes no plasma do rato (ALPONTI & SILVEIRA 2010), uma sensível (DPPIV-DS) e outra insensível (DPPIV-DI) à diprotina-A, sendo este composto até então considerado seu inibidor canônico (RAHFELD *et al.* 1991). A atividade DPPIV-DI corresponde à proteína CD26 canônica. Além disso, a distribuição de CD26 no hipotálamo é influenciada pelas situações de obesidade induzida por MSG e pelo jejum (ALPONTI *et al.* 2011c). Atualmente, a DPPIV já não é a única proteína conhecida capaz de clivar dipeptídeos Xaa-Pro ou Xaa-Ala na porção N-terminal, já que outras moléculas, exibindo vários graus de homologia estrutural e atividade similar à DPPIV, vêm sendo descobertas. As proteínas DPP2 (MAES *et al.* 2007), DPP6 (NADAL *et al.* 2003), DPP8, DPP9 (ABBOTT *et al.* 2000, OLSEN & WAGTMANN 2002, BJELKE *et al.* 2006, FRERKER *et al.* 2007) e DPP10 (QI *et al.* 2003, JERNG *et al.* 2004, 2005) são as formas relacionadas à DPPIV. A DPP2 possui baixa similaridade estrutural com a proteína DPPIV, porém possui atividade catalítica DPPIV, cuja eficiência diminui drasticamente quanto maior for o comprimento da cadeia peptídica do substrato (MAES *et al.* 2007). O sítio ativo de serina é substituído pela glicina na DPP10, resultando na perda de atividade DPPIV. O resíduo serina é também substituído na DPP6, a qual não apresenta atividade peptidásica. A DPP8 e a DPP9 possuem sítios ativos, respectivamente, 74% e 69% similares ao da DPPIV (Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly) (QI *et al.* 2003, BJELKE *et al.* 2006, FRERKER *et al.* 2007). A DPP8 hidrolisa substratos da DPPIV como Ala-Pro, Arg-Pro e Gly-Pro (QI *et al.* 2003, BJELKE *et al.* 2006, FRERKER *et al.* 2007). A DPP9 tem atividade DPPIV e está envolvida com a regulação da proliferação e sobrevivência celular por meio da modulação de cascatas de sinalização (YAO *et al.* in press). A DPPIV já é alvo terapêutico

consagrado por sua ação sobre o GLP-1, o qual promove efeitos anti-diabetogênicos (diabetes melito tipo 2) no tecido pancreático (SANCHO *et al.* 2005). Inibidores da DPPIV como o vildagliptin (Galvus; LAF-237) (MARI *et al.* 2005), o sitagliptin (Januvia; MK-0431) (BERGMAN *et al.* 2006) e o saxagliptin (BMS-477118) (BARNETT 2006) são usados correntemente como medicamentos, mas graves efeitos colaterais têm sido relatados recentemente, como leucopenia severa e outras anormalidades hematológicas (PITOCCO *et al.* 2011). A saliva venenosa do lagarto *Heloderma horridum* (monstro de gila) deu origem a um análogo (exenatida) do GLP-1, resistente à DPPIV (TRIPLIT & CHIQUETTE 2006), lançado no mercado farmacêutico brasileiro pela Eli Lilly com o nome comercial Byetta®.

2. OBJETIVOS

Avaliar se existe APA, APB, APM, DPPIV, MetAP e PSA no adipócito e se a obesidade hipotalâmica e a privação alimentar podem afetar estas atividades enzimáticas nesta célula e sua interação com peptídeos relacionados.

3. JUSTIFICATIVAS E ESTRATÉGIAS DE ESTUDO

O presente estudo pretende contribuir para evidenciar novos mecanismos atuantes no balanço energético e relacionados com a existência de APA, APB, APM, DPPIV, MetAP e PSA no adipócito e com a relação destas enzimas com LAP/CAP/IRAP e com as situações de obesidade e privação alimentar, avaliando se nessas situações ocorrem modificações na translocação destas peptidases nos adipócitos *in vitro* pela ação de ANG II e IV e AVP, comparativamente à insulina. Substratos naturais, identificados ou potenciais, de APA (ANG I e II e CCK8), APB (BK, leucotrieno A4, calidina, Leu e Met-encefalina, somatostatina e ANG III), APM (BK, calidina, ANG III, ANG IV, IL-8, Leu- e Met-encefalinas, substância P, γ e β endorfina, e somatostatina), LAP/CAP/IRAP (AVP, OXT e somatostatina) e DPPIV (NPY, peptídeo YY, β -endorfina, GHRH, substância P, GLP-1, enterostatina e ANG IV), estão envolvidos no controle do estado nutricional e do balanço energético. Além disso, alterações das atividades DPPIV e APN, assim como alterações na expressão gênica e proteica de CD13 e CD26, observadas no plasma, hipotálamo e hipocampo de ratos MSG e privados de alimento, demonstram o envolvimento dessas enzimas na regulação endócrina do balanço energético. A identificação de atividade LAP/CAP/IRAP permite supor a existência de outras atividades peptidásicas também reguladas por insulina no tecido adiposo e/ou a inter-relação desta

IRAP com outras peptidases, bem como a funcionalidade e o envolvimento de alterações dessas atividades em distúrbios relacionados a esse controle. Portanto, o presente estudo vem atender a necessidade de identificar outras IRAPs e possíveis interações entre a LAP/CAP/IRAP com outras peptidases, especialmente entre as enzimas supracitadas e a MetAP2. Por outro lado, ainda que as atividades aminopeptidásicas nos adipócitos possam sobrepor-se em proteína(s) idêntica(s) ou similar(es) à IRAP, estas ainda não foram estudadas nos adipócitos e nem quanto à especificidade a diferentes substratos derivados de naftilamida, ou em sua modulação por insulina, ANG II, ANG IV e AVP, bem como em distúrbios relacionados a esse controle. Estes estudos são fundamentais para posterior abordagem do mecanismo de ação da(s) IRAP(s), para identificação de novas proteínas que interajam com a(s) IRAP(s), bem como para a identificação de moduladores envolvidos na grande variedade de respostas celulares direta ou indiretamente sensíveis às variações dos níveis insulínicos e glicêmicos, em especial do próprio adipócito.

Assim, a presente proposição compreende as hipóteses ilustradas na Figura 4 e a seguinte estratégia de estudo:

3.1. Relacionar os níveis de atividades catalíticas de APA, APB, APM, CAP, DPPIV, LAP, MetAP e PSA com as situações de obesidade e privação alimentar em frações adipocíticas FM, LDM e HDM e em adipócitos totais isolados dos depósitos de gordura retroperitoneal de animais normais, normais privados de alimento, obesos induzidos por glutamato monossódico e obesos privados de alimento.

3.2. Relacionar os níveis de expressão gênica de APA, APB, APM, LAP/CAP/IRAP, DPPIV/CD26, MetAP e PSA destes adipócitos totais isolados com as situações de obesidade e privação alimentar (adipócitos isolados de animais normais, normais privados de alimento, obesos induzidos por glutamato monossódico e obesos privados de alimento).

3.3. Verificar se as atividades catalíticas de APA, APB, APM, CAP, DPPIV/CD26, LAP/CAP/IRAP, MetAP e PSA sofrem translocação sob ação de alguns de seus substratos peptídicos importantes no controle do estado nutricional e do balanço energético, procedendo a incubação *in vitro* de adipócitos isolados dos animais supracitados com estes peptídeos (ANG II, ANG IV, AVP e insulina [padrão de comparação] e salina [controle]) e avaliando a distribuição destas atividades catalíticas nas frações FM, LDM e HDM.

Figura 1. Sabe-se que a interação da insulina com seu receptor promove a translocação da vesícula contendo o transportador de glicose GLUT4 e a aminopeptidase regulada por insulina (IRAP), do citosol para a membrana plasmática do adipócito. As questões avaliadas neste estudo são: (i) As aminopeptidases neutra insensível (APM) e sensível (PSA) à puromicina, ácida (APA), básica (APB), cistil aminopeptidase (CAP), dipeptidil peptidase IV (DPPIV) e metionil aminopeptidase (MetAP) existem em adipócitos? (ii) As atividades catalíticas e expressões gênicas destas enzimas seriam reguladas (tal como a IRAP) por insulina e, adicionalmente, por angiotensinas (ANG II e IV) e vasopressina (AVP)? (iii) As atividades catalíticas e distribuição dessas peptidases no adipócito estariam alteradas nas situações de obesidade hipotalâmica e privação alimentar?

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais estão sumarizados na Figura 2.

Figura 2. Esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais adotados no presente estudo.

4.1. Animais e tratamentos

Ratos Wistar, de diferentes ninhadas, foram, imediatamente após o nascimento, alojados, cada 10 filhotes e uma mãe lactante, em uma caixa de polipropileno (comprimento x largura x altura = 56×35×19 cm), com alimento e água de torneira *ad libitum*, sendo esta acondicionada em uma estante ventilada (Alesco Ind. Com. Ltda, Brasil), sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($65 \pm 1\%$) e fotoperíodo 12:12 claro/escuro (início do período claro às 6:00 am).

Após 24 horas do nascimento, os filhotes foram subdivididos em 2 grupos, tratados segundo metodologia de Kaufhold *et al.* (2002), adaptada por Alponi & Silveira (2010), como segue:

- grupo i-MSG: recebeu, diariamente, entre 7:30-9:00 h do período claro (13:30-15:00 h am) injeção subcutânea (sc) na região cervical, em bolus, de 4 mg de ácido L-glutâmico sal monossódico (Sigma) (em NaCl 0,9%) por g de massa corporal, num volume máximo de 0,2 mL, até completar 10 dias de idade;

- grupo i-C (controle): recebeu o mesmo volume de NaCl 0,9% sc, no mesmo esquema supracitado, até completar 10 dias de idade.

Os animais neonatos foram mantidos com as fêmeas lactantes (10 animais por fêmea) até o 21º dia, quando foram desmamados. As fêmeas foram então eutanasiadas por decaptação.

Aos 90 dias de idade os dois grupos de animais supracitados (i-MSG e i-C) foram novamente subdivididos, cada qual em dois grupos:

i-MSG foi dividido em:

- grupo MSG: animais obesos selecionados por características biométricas peculiares, quais sejam: índice de Lee ($> 0,300$) (NAKAGAWA *et al.* 2000), massa corporal (BW) (300-350 g), comprimento nasoanal (NAL) (20-22 cm), massa do depósito de gordura retroperitoneal ($>6,5$ g), lipócrito ($>0,12$) e diâmetro médio (Dm) dos adipócitos ($>120 \mu\text{m}$);

- grupo MSG-FD: animais obesos selecionados pelas características supracitadas e submetidos à privação de alimento, a qual foi feita transferindo-os para gaiolas individuais e mantendo-os sem alimento e com água *ad libitum* durante 72 h, a partir das 7:30-9:00 período claro (13:30-15:00 h am).

i-C foi dividido em:

- grupo C: animais sadios sem outro tratamento;

- grupo FD: animais sadios sem outro tratamento e submetidos ao mesmo regime de privação alimentação supracitado.

Ratos saudáveis de 90 dias de idade, sem qualquer tratamento, foram utilizados para obter adipócitos destinados à padronização dos ensaios de atividade peptidásica.

Os animais obesos MSG (MSG e MSG-FD), privados de alimento (FD) e os controles (C) foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e, então, deles foram retirados os depósitos de gordura retroperitoneal para uso nos procedimentos experimentais previstos. Os animais i-MSG, fora dos padrões de seleção, foram eutanasiados pelo mesmo procedimento.

Os animais e protocolos experimentais para uso neste estudo estão em conformidade com a COBEA - BRASIL e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan (protocolo 684/09).

4.2. Parâmetros biométricos

Foram mensurados BW, NAL, índice de Lee ($BW[\text{em g}]^{0,33} / NAL[\text{em cm}]$) e massa (g) total dos depósitos de gordura retroperitoneal e periepididimal de cada animal.

4.3. Obtenção dos adipócitos

Após dissecação manual e lavagem com solução de 0,9% NaCl, o tecido adiposo retroperitoneal de cada animal foi individualmente submetido à digestão por collagenase, conforme descrito por Rodbell *et al* (1964) e Lima *et al* (1991), isto é: para cada 1 g de tecido foi adicionado 3 mL de DMEM (Cultilab, Brasil) contendo 25 mM HEPES (pH 7,5), 4% albumina sérica bovina (BSA) e 5 mg collagenase / mL; a incubação foi a 37°C, por 1 h, com leve agitação em mesa agitadora. Após este procedimento de digestão, o incubado foi lavado a 25°C com cerca de 8 volumes, ou seja, 1 volume de incubado: 8 volumes de tampão de lavagem (115 mM NaCl, 0,8 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 5,3 mM KCl, 1,4 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0,89 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 25 mM HEPES, 1 mM Na-piruvato, 145 mM BSA) e filtrado através de uma rede de náilon. Este filtrado foi, então, centrifugado a 200 rpm, por 1 minuto. O pellet contendo estroma vascular (capilares, células endoteliais, mastócitos, macrófagos e célula epiteliais) foi retirado por aspiração e descartado, enquanto o sobrenadante, contendo a suspensão de adipócitos, foi lavado, a 25°C, com o mesmo volume do mesmo tampão de lavagem, a 25°C, e submetido a nova centrifugação a 200 rpm por 1 minuto. Este último procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido mais 2 vezes. Então, foi feita uma observação microscópica da suspensão de adipócitos isolados para verificar a ausência do estroma vascular e avaliar o lipócrito e o Dm dos adipócitos. Após, a amostra de adipócitos isolados obtida de cada animal foi imediatamente utilizada para incubação com peptídeos e posterior obtenção do homogenato total dos adipócitos (para quantificação das atividades enzimáticas) ou foi utilizada para a extração de RNA.

4.4. Contagem dos adipócitos isolados

O número de adipócitos por mL da suspensão celular (amostra) foi determinado através da seguinte fórmula: $(\text{lipócrito}/V) \times 10^{12}$, sendo V = volume médio dos adipócitos (em μm^3) obtido com base no Dm estimado (em μm), por meio da fórmula $\pi Dm^3/6$. O número de adipócitos por grama de tecido foi determinado através da seguinte fórmula: MAT (massa total de adipócitos)/ MAC (massa do adipócito), onde $MAC(g) = 0,91(\text{densidade dos adipócitos}) \times V$ e $MAT = 3 \text{ g}$ (quantidade de tecido utilizado para realização dos experimentos) (MARTIN & DRINKWATER 1991, HOEKSTRA 2011).

O lipócrito (fração do volume total da suspensão celular ocupada pelos adipócitos) foi avaliado conforme a metodologia de Di Girolamo *et al.* (1971). Para isso, foram aspirados 50 μL das amostras individuais de adipócitos isolados obtidos de cada animal (suspensão celular), através de um capilar, o qual foi, então, colocado num tubo de poliestireno de 15 mL e centrifugado a 400 X g por 2 min. Os adipócitos formaram uma fase na parte superior do capilar. Com uma régua, foi medida a coluna que contém o volume total da solução e a coluna desta fase que contém os adipócitos, para o cálculo da razão entre elas.

O Dm foi estimado aplicando-se 10 μL da suspensão celular em uma lâmina, na qual foi colocado reforço plástico transparente nas duas extremidades para evitar que a lamínula pressionasse as células e alterasse seu diâmetro. Os adipócitos foram visualizados no microscópio e o Dm individual foi medido em cem adipócitos aleatoriamente escolhidos, utilizando o software Image-Pro-Plus® (Media Cybernetics).

4.5. Incubação dos adipócitos com peptídeos

A suspensão de adipócitos isolados de cada animal foi incubada por 15 min a 37°C, sob leve agitação, após a adição de tampão KRBH-BSA (121 mM NaCl, 1,2 mM MgSO_4 , 4,9 mM KCl, 2,4 mM NaH_2PO_4 , 0,33 mM CaCl_2 , 20 mM HEPES, pH 7,4, 4% BSA, 5 mM glicose), na proporção de 3 mL de tampão para cada g de tecido adiposo que originou a suspensão, com salina ou com 10^{-6} M (NAKAMURA *et al.* 2000) de um dos seguintes peptídeos (dissolvidos em diluente recomendado pelo fornecedor e adicionados ao tampão KRBH-BSA): ANG II, ANG IV, AVP e insulina. Os incubados foram, então, imediatamente utilizados no procedimento do item seguinte.

4.6. Obtenção das frações de membrana e de baixa e alta densidade microsomal do adipócito

Foi realizada em conformidade com as metodologias descritas por McKeel & Jarett (1970) e Simpson *et al* (1983), como discriminado a seguir. Todos os processos (homogeneizações,

centrifugações e transportes das amostras de tecido adiposo) foram realizados a 4°C. A suspensão celular foi sonicada por 20s a uma amplitude de 20% e centrifugadas a 2.000 X g, por 10 min, em tampão de homogeneização (20 mM Tris-HCl / 255 mM de sacarose, pH 7,4, 20°C). Este tampão de homogeneização foi usado em todo processo de fracionamento celular. A camada superior de gordura foi descartada e o infranadante foi coletado. Foi adicionado 0,1% de Triton X-100 ao infranadante (em relação ao seu volume final), o qual foi homogeneizado em “potter” de vidro a 800 rpm, por 3 min e centrifugado a 2.000 X g, por 10 min. A camada superior de gordura foi descartada e o infranadante foi coletado, ao qual foi adicionado 0,777 mL de tampão de homogeneização / g de tecido adiposo que originou a suspensão. O infranadante foi homogeneizado com 10 subidas e decidas na haste de teflon em “potter” de vidro (HOMOGENATO 1 – H-1). Então, H-1 foi ultracentrifugado (Hitachi model HIMAC CP60E) a 16.000 X g por 15 min. A gordura solidificada localizada na camada superior foi cuidadosamente removida e descartada. A camada intermediária (CI-1) inicial foi removida e reservada para posterior preparação do HDM e LDM. Este pellet (P-1) foi ressuspensionado com 0,777 mL do tampão de homogeneização / g de tecido adiposo originário e ultracentrifugado a 16.000 X g por 15 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet (P-2) foi novamente ressuspensionado em 2 mL de tampão de homogeneização e cuidadosamente transferido para outro tubo sobre uma camada de solução de sacarose (1.12 M sacarose contendo 20 mM Tris-HCl previamente aplicada ao fundo do tubo) e, então, ultracentrifugado a 101.000 X g por 70 min. A fração de membrana plasmática foi coletada de uma camada intermediária (CI-2) que foi formada após a centrifugação. A CI-2 foi ressuspensionada em 0,645 mL do tampão de homogeneização por g de tecido adiposo originário e ultracentrifugada a 48.000 X g por 45 min. Após esta ultracentrifugação, o pellet (P-3) formado foi ressuspensionado com 0,645 mL do tampão de homogeneização por g de tecido adiposo originário e novamente ultracentrifugado a 48.000 X g por 45 min. O novo pellet (P-4), contendo a fração de membrana (FM), foi solubilizado num mesmo volume (0,645 mL) de tampão de homogeneização.

A CI-1, anteriormente reservada para a preparação das frações HDM e LDM, foi centrifugada a 48.000 X g por 20 min. O pellet (P-5) obtido foi reservado para preparação do HDM e o sobrenadante, contendo a fração LDM, foi ultracentrifugado a 180.000 X g por 70 min. O pellet formado (P-6) foi ressuspensionado com 0,83 mL de tampão de homogeneização por g de tecido adiposo originário e ultracentrifugado a 180.000 X g durante 70 min. O novo pellet (P-LDM), contendo a fração LDM, foi ressuspensionado num mesmo volume de tampão de homogeneização, acrescido de 0,1% de Triton X-100. O P-5, anteriormente reservado, foi ressuspensionado com 0,83 mL de tampão de homogeneização por g de tecido adiposo originário e ultracentrifugado a 48.000 X g durante 20 min. Este novo pellet (P-HDM), contendo a fração HDM, foi ressuspensionado num mesmo

volume de tampão de homogeneização, acrescido de 0,1% de Triton X-100. Todas as frações foram imediatamente congeladas em gelo seco e armazenadas a -80°C até a utilização, num máximo de 15 dias.

4.7. Extração do RNA

O RNA da suspensão de adipócitos isolados de cada animal foi extraído utilizando o RiboPure™ Kit (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. Em resumo, a amostra foi homogeneizada sobre gelo com TriReagent® (Applied Biosystems, EUA) (1 mL de TriReagent® para cada 0,05 a 0,1 mg de tecido inicial), em Poly Tron® a 11.000 rpm. Sequencialmente, as amostras foram incubadas por 5 min a 25°C e centrifugadas a 12.000 X g, por 10 min a 4°C. Para cada 1 mL de amostra, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, misturando no vórtex por 15s. As amostras foram incubadas por 5 min a 25°C e depois centrifugadas a 12.000 X g, por 10 min a 4°C. Após centrifugação, o RNA encontra-se na fase aquosa, enquanto o DNA e as proteínas estão presentes na interfase e na fase fenol. 400 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo, misturados com 200 µL de etanol 100%, homogeneizada no vórtex por 15 s e transferida para um complexo filtro-tubo coletor (fornecida com o kit). O complexo filtro-tubo coletor foi centrifugado a 12.000 X g, por 30s a 25°C; o líquido que escoou para o tubo coletor foi descartado, e o filtro foi colocado no mesmo tubo coletor, o RNA ficou ligado ao filtro. Foram aplicados 500 µL de solução de lavagem (fornecida com o kit) ao complexo filtro-tubo coletor. O complexo filtro-tubo coletor foi novamente centrifugado a 12.000 X g, por 30s a 25°C e o líquido que escoou para o tubo coletor foi descartado. A lavagem e a centrifugação foram repetidas mais uma vez e o líquido que escoou também foi descartado. Então, o complexo filtro-coletor foi centrifugado a 12.000 X g por 30 s a 25°C, para remover resíduos da solução de lavagem. O filtro foi transferido para um novo tubo coletor e foram adicionados 100 µL de tampão de eluição (fornecido com o kit) na coluna do filtro, seguido de uma incubação de 2 min a 25°C. Após essa incubação, o complexo filtro-tubo coletor foi centrifugado a 12.000 X g, por 30 s a 25°C. O RNA recuperado foi estocado a -20°C. O RNA total isolado foi quantificado espectrofotometricamente (espectrofotômetro Synergy H1, Bio Tek) pela medida da absorbância a 260 nm e avaliado, quanto à pureza, pela razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. A qualidade do RNA total foi avaliada pela existência somente das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 25S e 18S, obtidas na eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão Tris/acetato de sódio/EDTA 1x, pH 8, sob voltagem constante (80 V), visualizadas por meio de coloração com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ mL) sob luz ultravioleta.

4.8. Transcrição Reversa (construção da fita de DNA complementar – cDNA)

Foi adicionado EDTA 15 mM na solução de RNA, a qual foi aquecida a 75°C, por 10 min, para inativar a DNase. Foram utilizados até 2 µg de RNA (que estavam contidos em no máximo 9 µL) para a transcrição reversa, utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, EUA). Foram adicionados 10 µL de tampão de reação (fornecido com o kit), 1 µL de mix de enzima (fornecido com o kit) e o volume foi completado para 20 µL com água DEPC (dietilpirocabonato). As amostras foram colocadas no termociclador por 60 min a 37°C seguido de 5 min a 95°C. Depois disso, as amostras foram armazenadas a -80°C.

4.9. PCR quantitativo em tempo real

A expressão da APA, APB, APM, CAP/LAP/IRAP, DPPIV/CD26, PSA, MetAP e GAPDH nas amostras foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) pelo sistema Taqman, no qual se utilizou, além dos pares de primers, uma sonda que se hibridiza de forma específica com a fita molde de cDNA antes do par de primers. As condições do termociclador (Applied Biosystems, EUA) para a reação de PCR foram: 1 ciclo de 2 min a 50°C, 1 ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos: 15s a 95°C e 1 min a 60°C. Os primers e sondas são:

APA sense – 5'-GGTGGAGATGCGTCGTTTAT-3'

Sonda - Taqman-ACGGAGTCCTCATTCCACC

APA anti-sense - 5'-CTGATTTGGCAGCCTGTTTT-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_001977);

APB sense – 5'-TCTGTGACTCTTGGGCCTCT-3'

Sonda – Taqman-GAGACAGAGAACCTGCCCCAC

APB anti-sense – 5'-GCCCTTTGCATAAAATCAGC-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_020216)

APM sense – 5'-TGTCAGACTGCCAGACACCT-3'

Sonda – Taqman-GGAAGCCCAGCTCTGAGTCT

APM anti-sense – 5'-GTGCCCTGTTGATTCTTTG-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_031012);

CAP/LAP/IRAP sense – 5'-ATGGCCAGGAATCTGAAAAC-3';

Sonda – Taqman-AGTCAGAGGCAACCTTGCAG

CAP/LAP/IRAP anti-sense – 5'-TTTGCGAAAGCAGCAGA-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_005575);

DPPIV/CD26 sense - 5'-ACAAGAGAAGCGGGAACAGA-3'

Sonda – Taqman-GAAACCCAGGTCCAAGCATA

DPPIV/CD26 anti-sense – 5'-GTCCCTTGCATTTCTTTGGA-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_012789);

MetAP sense – 5'-TGAATCGCGACCTGGATCCA-3'

Sonda – Taqman-ACGACAGTCTTACAGTACGA

MetAP anti-sense – 5'-ACTACATGAAAAATTTTGATG-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_022539);

PSA sense – 5'-CCTCAAGCCTGCCATGGTCAAAGT-3'

Sonda - Taqman-ACAGGGCTATGCCATTGC

PSA anti-sense- 5'-CTGGGAAGGGAGGGAGGGTGGTT-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_080395).

Como controle positivo, foi utilizado o GAPDH, cujos primers foram:

GAPDH sense – 5'- AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'

Sonda – Taqman-GCCAGCCTCGTCTCATAGAC

GAPDH anti-sense – 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3' (Nº de acesso ao GenBank: NM_017008).

No método comparativo, para expressão relativa de um gene-alvo em comparação a um gene de referência e baseado na eficiência dos primers (PFAFFL 2001), a quantidade do gene-alvo foi normalizada a um controle endógeno e calculada em relação a um calibrador, o qual é a amostra do animal controle sadio.

4.10. Proteína

O teor proteico (FM, LDM e HDM) foi medido a 630 nm espectrofotômetro (BioTek, EUA) em triplicata, pelo método de Bradford (1976), usando o kit Bio-Rad (Bio-Rad, EUA) tendo, como padrão, BSA dissolvida no mesmo diluente da amostra.

4.11. Atividades peptidásicas

4.11.1. Varredura dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Para estabelecer a otimização da relação dos comprimentos de onda de excitação e de emissão para o ensaio fluorimétrico das atividades peptidásicas sob estudo nos adipócitos, foi realizada uma varredura dos valores de fluorescência de curva padrão de β -naftilamina (produto da hidrólise dos substratos de β -naftilamida utilizados para determinação das atividades peptidásicas) no intervalo de 300 a 400 nm (excitação) e de 400 a 500 nm (emissão), utilizando os seguintes tampões: Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo BSA 0,1 mg/mL e 1mM $MnCl_2$; fosfato, 0,05 M, pH 6,5, contendo BSA 0,1 mg/mL, 150 mM de NaCl e 0,02 mM de puromicina; fosfato, 0,05 M, pH 6,5, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT); fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL e 2 mM DTT; fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DTT, na presença e

ausência de 0,02 mM de puromicina; Tris-maleato, 0,05 M, pH 6,0, contendo BSA 0,1 mg/mL; Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo BSA 0,1 mg/mL.

4.11.2. pH ótimo da reação enzimática

O pH ótimo para cada uma das atividades peptidásicas sob estudo foi determinado pela medida fluorimétrica, em comprimento de onda de 415 nm de emissão e de 335 nm de excitação, de β -naftilamina liberada, segundo metodologia adaptada de Keller *et al.* 2002, Irazusta *et al.* 2001, Gasparello-Clemente *et al.* 2003, Varona *et al.* 2003 e Narayanan *et al.* 2008. Essa liberação representa o resultado da incubação das amostras de frações dos adipócitos provenientes de animais saudáveis (sem tratamento) com substratos derivados de naftilamida, diluídos para 0,125 mM (para APA, APM, CAP, PSA, MetAP e LAP/IRAP), 0,5 mM (para APB), 0,2 mM (para DPPIV) tamponados em diferentes pHs (vide Resultados), num volume final de 300 μ L, por 180 min a 37°C, em microplacas (Corning, USA). O maior valor do incubado, correspondente ao tempo zero ou na ausência da amostra, foi descontado (branco). Os seguintes substratos e tampões foram utilizados:

4.11.2.1. APA, L-ácido aspártico α -(β -naftilamida) (solubilizado em 0,012 N NaOH) em tampão Tris-HCl, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL e 1mM MnCl₂;

4.11.2.2. APB, L-arginina- β -naftilamida (solubilizada em H₂O) em tampão fosfato, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL, 150mM de NaCl e 0,02 mM de puromicina;

4.11.2.3. APN, L-Ala- β -naftilamida (Sigma) (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão fosfato, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), na presença e ausência de 0,02 mM de puromicina;

4.11.2.4. CAP, L-Cys-di- β -naftilamida (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão Tris maleato, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL;

4.11.2.5. DPPIV, Gly-Pro- β -naftilamida (solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma) em tampão Tris-HCl, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL;

4.11.2.6. LAP/IRAP, Leu- β -naftilamida (solubilizada em metanol) em tampão fosfato, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT);

4.11.2.7. MetAP, H-Met- β -naftilamida (solubilizada em ácido acético 80%) em tampão tampão fosfato, 0,05 M, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT);

4.11.3. Parâmetros da cinética enzimática

A otimização das condições de ensaio e estimativa dos valores aproximados para V_{max}, K_{cat} e K_m foram realizadas pelo método de Michaelis-Menten, com ajustes e validação pelo método de

Lineweaver-Burk, utilizando amostras de frações dos adipócitos provenientes de animais saudáveis (sem tratamento) incubadas com solução tamponada de substratos em diferentes concentrações (vide Resultados), como segue:

4.11.3.1. *APA*, L-ácido aspártico α -(β -naftilamida) (solubilizado em 0,012 N NaOH) em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo BSA 0,1 mg/mL e 1mM MnCl₂;

4.11.3.2. *APB*, L-arginina- β -naftilamida (solubilizada em H₂O) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 6,5, contendo BSA 0,1 mg/mL, 150 mM de NaCl e 0,02 mM de puromicina;

4.11.3.3. *APN*, L-Ala- β -naftilamida (Sigma) (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), na presença e ausência de 0,02 mM de puromicina;

4.11.3.4. *CAP*, L-Cys-di- β -naftilamida (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão Tris maleato, 0,05 M, pH 6, contendo BSA 0,1 mg/mL;

4.11.3.5. *DPPIV*, Gly-Pro- β -naftilamida (solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma) em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo BSA 0,1 mg/mL;

4.11.3.6. *LAP/IRAP*, Leu- β -naftilamida (solubilizada em metanol) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), pH 7,4;

4.11.3.7. *MetAP*, H-Met- β -naftilamida (solubilizada em ácido acético 80%) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), pH 6,5;

4.11.4. Condições ótimas de ensaio das atividades peptidásicas no adipócito.

Tais condições, estabelecidas pelos resultados obtidos nos itens 4.11.1 a 4.11.3, foram as seguintes:

4.11.4.1. *APA*, 0,05 mM L-ácido aspártico α -(β -naftilamida) (solubilizado em 0,012 N NaOH) em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo BSA 0,1 mg/mL e 1mM MnCl₂;

4.11.4.2. *APB*, 4 mM L-arginina- β -naftilamida (solubilizada em H₂O) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 6,5, contendo BSA 0,1 mg/mL, 150 mM de NaCl e 0,02 mM de puromicina;

4.11.4.3. *APN*, L-Ala- β -naftilamida (APM: 2,5 mM; PSA: 0,5 mM) (Sigma) (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), na presença e ausência de 0,02 mM de puromicina. Assim, duas atividades APN diferentes são mensuradas: aquela na presença de puromicina (atividade insensível à puromicina *APM*) e aquela resultante da subtração dos valores obtidos na presença de puromicina daqueles obtidos na ausência de puromicina (atividade sensível à puromicina *PSA*);

4.11.4.4. *CAP*, 1,5 mM L-Cys-di- β -naftilamida (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão Tris maleato, 0,05 M, pH 6, contendo BSA 0,1 mg/mL;

4.11.4.5. *DPPIV*, 0,2 mM Gly-Pro- β -naftilamida (solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma) em tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, contendo BSA 0,1 mg/mL;

4.11.4.6. *LAP/IRAP*, 1,5 mM Leu-4-metoxi- β -naftilamida (solubilizada em metanol) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), pH 7,4;

4.11.4.7. *MetAP*, 1,5 mM H-Met- β -naftilamida (solubilizada em ácido acético 80%) em tampão tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4, contendo BSA 0,1 mg/mL, 1 mM DL-ditiotreitol (DTT), pH 6,5.

4.12. Análise estatística e apresentação dos resultados

Os dados quantitativos são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente usando o programa computacional GraphPad Prism™. A análise de regressão linear foi utilizada para obter as curvas-padrão e cinética enzimática pelo método de Lineweaver-Burk. A ANOVA, seguida do teste de Tukey, quando cabível, foi utilizada para comparar os valores entre os diferentes grupos, frações e peptídeos. A análise de regressão não linear foi utilizada para análise cinética pelo método de Michaelis-Menten. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico mínimo de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros biométricos e avaliação morfométrica e de concentração dos adipócitos

Os valores de BW, NAL, índice de Lee, massa dos depósitos de gordura retroperitoneal e periepididimal, lipócrito, Dm e número de adipócitos por mL da suspensão celular (concentração de adipócitos) estão apresentados na Tabela 1. Os grupos MSG, MSG-FD e FD apresentaram menor BW que o grupo C. O grupo MSG-FD apresentou menor BW também em relação aos grupos MSG e FD. O NAL dos grupos MSG e MSG-FD foi menor que nos grupos C e FD. O índice de Lee foi maior em MSG e MSG-FD que em C e FD; no grupo FD o índice de Lee foi menor que em C. A massa dos depósitos de gordura retroperitoneal foi maior nos grupos MSG e MSG-FD em relação a C e FD. O grupo FD também apresentou menor massa dos depósitos de gordura retroperitoneal em relação ao grupo C, enquanto o grupo MSG apresentou menor massa desse mesmo depósito de gordura em relação a MSG-FD. O valor de Dm foi maior em MSG e MSG-FD em relação a C e FD, sendo que este último apresentou menor valor de Dm que em C. O número de adipócitos na suspensão celular foi maior em FD que em C, MSG e MSG-FD. O lipócrito dos grupos FD, MSG e MSG-FD foi maior em relação a C, porém foi menor em MSG e MSG-FD em relação a FD. O número de adipócitos por g de tecido adiposo retroperitoneal foi maior em FD em relação a C, MSG e MSG-FD, sendo que em MSG foi menor que em C. Não houve diferença entre os grupos C, MSG, MSG-FD e FD quanto a massa do depósito de gordura periepididimal.

Tabela 1. Comparação dos padrões biométricos e da morfometria dos adipócitos dos animais controles sadios tratados com salina (C), controles sadios tratados com salina e privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD).

Parâmetros	C	FD	MSG	MSG-FD
Massa Corporal (BW) (g)	377 ± 2,8 ^a (7)	353 ± 1,7 ^b (6)	343 ± 1,4 ^c (7)	329 ± 2,5 ^d (6)
Comprimento naso-anal (NAL) (cm)	24,2 ± 0,15 ^a (7)	24,3 ± 0,21 ^a (6)	21,6 ± 0,23 ^b (7)	21,7 ± 0,16 ^b (6)
Índice de Lee (BW^{0,33}/NAL) (g/cm)	0,292 ± 0,002 ^a (7)	0,282 ± 0,0005 ^b (6)	0,32 ± 0,0025 ^c (7)	0,32 ± 0,0033 ^c (6)
Gordura Periepididimal (g)	5,1 ± 0,05 (7)	5,2 ± 0,1 (6)	5,45 ± 0,17 (7)	5,54 ± 0,17 (6)
Gordura Retroperitoneal (g)	4,1 ± 0,09 ^a (7)	2 ± 0,09 ^b (6)	6,6 ± 0,09 ^c (7)	7,3 ± 0,11 ^d (6)
Lipócrito (cm)	0,05 ± 0,004 ^a (7)	0,16 ± 0,01 ^b (6)	0,14 ± 0,03 ^b (7)	0,14 ± 0,02 ^b (6)
Diâmetro médio (µm)	107,1 ± 0,74 ^a (7)	77,7 ± 2 ^b (6)	128,6 ± 1,8 ^c (7)	124,4 ± 1,2 ^c (6)
Número de adipócitos por mL de suspensão celular (células/mL)	0,95 x 10 ⁶ ± 0,05 x 10 ^{6a} (7)	7,48 x 10 ⁶ ± 0,52 x 10 ^{6b} (6)	1,28 x 10 ⁶ ± 0,07 x 10 ^{6a} (7)	1,42 x 10 ⁶ ± 0,04 x 10 ^{6a} (6)
Número de adipócitos por g de tecido	5,13 x 10 ⁶ ± 0,1 x 10 ^{6a} (7)	13,74 x 10 ⁶ ± 1,13 x 10 ^{6b} (6)	3 x 10 ⁶ ± 0,13 x 10 ^{6c} (7)	3,31 x 10 ⁶ ± 0,10 x 10 ^{6ac} (6)

Valores são média ± EPM. Número de animais entre parênteses. Os valores apresentados em cada coluna foram obtidos dos mesmos animais.

ANOVA, p<0,02; teste de comparação múltipla de Tukey, p<0,05: C vs FD vs MSG vs MSG-FD (letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos).

Na Figura 3, observa-se que os adipócitos brancos maduros são células redondas e com grande reservatório de triacilglicerídeo (gota lipídica).

Figura 3. Aparência típica, sob microscopia óptica de campo claro, de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal do rato. 10x. Barra = 100 μ m.

5.2. Parâmetros cinéticos e otimização da quantificação das atividades peptidásicas nas frações FM, HDM e LDM de adipócitos isolados.

As curvas de pH ótimo são apresentadas na Figura 4. Não foram detectadas atividades APB na FM, e APA e CAP na HDM. O pH ótimo para cada atividade: APA, pH 8,5; APB, pH 6,5; APM, pH 7,4; CAP, pH 6,0; DPPIV, pH 8,5; LAP/IRAP, pH 7,4; MetAP, pH 6,5; e PSA, pH 7,4.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de V_{max} , K_m , K_{cat} e da razão K_{cat}/K_m das atividades aminopeptidásicas nas diferentes frações (FM, HDM e LDM) dos adipócitos isolados de animais do grupo controle sadios sem tratamento, obtidos pela medida fluorimétrica da hidrólise de substratos derivados de naftilamida. Não foi possível determinar a cinética das atividades APB, APM, DPPIV e CAP na FM; e DPPIV e CAP na LDM, visto que os resultados não foram reprodutíveis. As atividades LAP/IRAP e PSA inexistem em FM de adipócitos de animais normais. Os valores que determinaram os resultados da Tabela 2 estão apresentados na Figura 5.

Figura 4. Curvas de pH das atividades aminopeptidase ácida (APA), básica (APB), neutra insensível (APM) e sensível à puromicina (PSA), cistil (CAP), dipeptidil peptidase IV (DPPIV), leucil (LAP)/aminopeptidase regulada por insulina (IRAP) e metionil (MetAP) em triplicatas de amostras individuais de fração de membrana plasmática (FM), de baixa densidade microssomal (LDM) e de alta densidade microssomal (HDM) de adipócitos de animais controle sadios (com tratamento com salina).

Valores são média $\pm$ E.P.M. de medianas de triplicatas de FM, LDM e HDM provenientes 3 animais (N=3) . Valores para Kcat (quantidade máxima de substrato [pmoles] convertido por segundo por unidade de enzima [UI]) foram calculados considerando 1 UI = quantidade de enzima, em 1 mg de proteína, a qual hidrolisa 1 pmole de substrato por segundo. A análise cinética foi realizada pelo método de Michaelis-Menten e ajuste linear pelo método de Lineweaver-Burk, utilizando o software GraphPad Prism™. APA, aminopeptidase ácida; APB, aminopeptidase básica; APM, aminopeptidase neutra insensível a puromicina; CAP, cistil aminopeptidase; DPPIV, dipeptidil peptidase IV; LAP/IRAP, leucil aminonopeptidase/aminopeptidase regulada por insulina; MetAP, metionil aminopeptidase; PSA, aminopeptidase neutra sensível à puromicina. ND = não determinado. A = ausente.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos estimativos das atividades peptidásicas nas frações de membrana plasmática (FM) e de alta (HDM) e baixa (LDM) densidade microsomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de ratos controles saudáveis (com tratamento com salina).

Atividade	Frações	Vmax (pmoles . min ⁻¹ . mg protein ⁻¹)	Kcat (s ⁻¹)	Km x 10 ⁻⁵ (mol/L)	Kcat/(Km x 10 ⁻⁵) (mol/L ⁻¹ . s ⁻¹)
APA	FM	178±6,35	2,96	0,8 ± 0,2	3,7
	HDM	22±0,58	0,36	1,1 ± 0,1	0,33
	LDM	10±0,06	0,16	1,4 ± 0,06	0,11
APB	FM	ND	ND	ND	ND
	HDM	456±16	7,60	85,7 ± 11,9	0,09
	LDM	2381±74	39,68	26,2 ± 5,9	1,51
APM	FM	ND	ND	ND	ND
	HDM	3499±341	58,32	34,4 ± 8,2	1,70
	LDM	5124±484	85,40	45,9 ± 9,5	1,90
CAP	FM	ND	ND	ND	ND
	HDM	158±40	2,63	48,5±19,2	0,05
	LDM	ND	ND	ND	ND
DPPIV	FM	ND	ND	ND	ND
	HDM	85±0,46	1,41	3,1 ± 0,09	0,45
	LDM	ND	ND	ND	ND
LAP/IRAP IRAP	FM	A	A	A	A
	HDM	1286±28	21,43	16,2 ± 1,1	1,32
	LDM	2295±131	38,25	38,1 ± 5	1
MetAP	FM	1496±180	24,93	16,83 ± 5,1	1,48
	HDM	1655±29	27,58	35,17 ± 1,6	0,78
	LDM	2199±119	36,65	22,70 ± 3,4	1,61
PSA	FM	A	A	A	A
	HDM	775±82	12,91	9,7 ± 2,5	1,33
	LDM	458±16	7,63	2 ± 0,3	3,81

Figura 5. Estimativa de parâmetros cinéticos de atividades peptidásicas em frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados de animais controles saudáveis com tratamento com salina. Valores são medianas de triplicatas de 3 animais.

5.3. Quantificação das atividades peptidásicas

5.3.1. *Ex vivo* (basal)

A Figura 6 mostra que a atividade APA basal na LDM e HDM provenientes dos adipócitos de FD é menor que a dos provenientes de MSG; enquanto que a atividade APA na HDM é menor em MSG-FD em relação à MSG. Ainda na Figura 6, a atividade MetAP apresentou alterações entre os grupos somente na FM, sendo maior em MSG, em relação a MSG-FD. Já a atividade PSA foi maior na LDM de MSG, em relação a C, FD e MSG-FD.

As Figuras 7 a 9 ilustram a distribuição das atividades aminopeptidásicas nas frações FM, LDM e HDM de animais dos grupos C, FD, MSG e MSG-FD. Pode-se observar que na FM de C, FD, MSG e MSG-FD, a atividade CAP (C: 32%; FD: 41%; MSG: 29%; MSG-FD: 47%) foi predominante (Figura 7). Na LDM, os animais C apresentaram predominância da atividade MetAP (31%), enquanto os animais MSG apresentaram predominância das atividades APM (31%) (Figura 8). A atividade APM foi predominante também na HDM de FD (37%) (Figura 9).

Figura 6. Atividade basal ($\text{pmoles min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$) de aminopeptidase ácida (APA), básica (APB), neutra insensível a puromicina (APM), cistil (CAP), dipeptidil aminopeptidase IV (DPPIV), leucil (LAP/IRAP), e metionil (MetAP) aminopeptidases, e aminopeptidase neutra sensível à puromicina (PSA), em frações de membrana plasmática (FM) e de alta (HDM) e baixa (LDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de ratos controle (C), controle privado de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD). Valores são média $\pm$ EPM de medianas de triplicatas de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, C vs FD vs MSG vs MSG-FD: APA FM $p=0,0180$, APA LDM $p=0,0065$, APM HDM $p=0,0036$, APB FM $p=0,3627$, APB LDM $p=0,1962$, APB HDM $p=0,4915$, APM FM $p=0,8437$, APM LDM $p=0,9662$, APM HDM $p=0,6317$, CAP FM $p=0,7599$, CAP LDM $p=0,6708$, CAP HDM $p=0,2321$, DPPIV FM $p=0,8246$, DPPIV LDM $p=0,5495$, DPPIV HDM $p=0,2706$, LAP/IRAP FM $p=0,8880$, LAP/IRAP LDM $p=0,9930$, LAP/IRAP HDM $p=0,6336$, MetAP FM $p=0,0103$, MetAP LDM $p=0,3892$, MetAP HDM $p=0,8839$, PSA FM $p=0,2487$, PSA LDM $p=0,0063$, PSA HDM $p=0,2407$; teste de comparação múltipla de Tukey ($p<0,05$, diferentes na mesma fração indicam diferença significativa entre os tratamentos).

Figura 7. Distribuição percentual das atividades peptidásicas, relativamente à soma destas atividades (100%), na fração de membrana da gordura retroperitoneal de ratos controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD). Valores são a média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, APA vs APB vs APM vs CAP vs LAP/IRAP vs MetAP vs PSA: C $p=0,0009$, FD $p=0,0009$, MSG $p=0,0310$, MSG-FD $p=0,0074$; teste de comparação múltipla de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes na mesma fração indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas em cada fração).

FM

C

FD

MSG

MSG-FD

Figura 8. Distribuição percentual das atividades peptidásicas, relativamente à soma destas atividades (100%), na fração de baixa densidade microssomal (LDM) da gordura retroperitoneal de ratos controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD). Valores são a média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, APA vs APB vs APM vs CAP vs LAP/IRAP vs MetAP vs PSA: C $p=0,0019$, FD $p=0,0828$, MSG $p=0,0053$, MSG-FD $p=0,0811$; teste de comparação múltipla de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes na mesma fração indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas em cada fração).

LDM

C

FD

MSG

MSG-FD

Figura 9. Distribuição percentual das atividades peptidásicas, relativamente à soma destas atividades (100%), na fração de alta densidade microssomal (HDM) da gordura retroperitoneal de ratos controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD). Valores são a média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses. ANOVA, APA vs APB vs APM vs CAP vs LAP/IRAP vs MetAP vs PSA: C $p=0,0802$, FD $p=0,186$, MSG $p=0,1285$, MSG-FD $p=0,1075$; teste de comparação múltipla de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes na mesma fração indicam diferença significativa entre as atividades enzimáticas em cada fração).

HDM

C

FD

MSG

MSG-FD

5.3.2. *In vitro*

5.3.2.1. Modulação das atividades peptidásicas por peptídeos

As Figuras 10 a 16 mostram o perfil das atividades aminopeptidásicas sob os diferentes estímulos (insulina, AVP, ANG II e ANG IV) e na situação basal (salina), em uma mesma fração dos adipócitos (FM, LDM ou HDM) em cada condição/tratamento aplicado (C, FD, MSG ou MSG-FD). As eventuais alterações nos níveis de atividade entre os diferentes peptídeos aplicados como estímulos e a situação basal em um mesmo tratamento e mesma fração adipocítica refletem alterações na modulação desta atividade por este peptídeo em cada fração em função da condição/tratamento aplicado.

A Figura 10 mostra que não houve modulação, por nenhum peptídeo, da atividade APB na HDM em C, na LDM e HDM em FD e em nenhuma das frações em MSG-FD. Em C, APB foi maior na FM e LDM, na presença de ANG IV, em relação à situação basal (salina) e AVP. A atividade APB na FM de FD também foi maior na presença de ANG IV, em relação a situação basal e ANGII. APB foi maior na presença de insulina, em relação à situação basal (salina) na FM e HDM em MSG. A APB na LDM e HDM em MSG foi maior na presença de ANG II que nas situações basal (salina), ou sob insulina, ANG IV e AVP.

A APM foi maior (Figura 11) na FM de C sob ANG IV, em relação à condição basal, AVP, e ANG II. Em MSG, APM na FM foi maior sob insulina, em relação à condição basal. Na FM de MSG-FD a APM foi maior na condição basal, em relação à AVP e ANG II. Na LDM e HDM em C, MSG e MSG-FD e em todas as frações em FD, não houve modulação da atividade APM por nenhum peptídeo.

A Figura 12 mostra que não houve modulação, por nenhum peptídeo, da atividade CAP em nenhuma das frações em C, FD e MSG-FD. Em MSG, CAP foi maior após a incubação com insulina, em relação à ANG IV. Na LDM e HDM de MSG a atividade CAP foi maior sob AVP, em relação à ANG IV. Na FM de C e na LDM de MSG-FD o teste post-hoc não apontou o(s) valor(es) significativamente diferente(s), apesar de sua(s) existência(s) ter(em) sido apontada(s) pelo ANOVA.

Em C a atividade DPPIV (Figura 13) foi maior na FM após incubação com ANG IV, em relação à situação basal. Na FM e LDM de MSG a DPPIV foi maior sob insulina, em relação à condição basal e ANG IV. Já em FD e MSG-FD, não houve modulação, por nenhum dos peptídeos, da atividade DPPIV. Na LDM de MSG-FD o teste post-hoc não apontou o(s) valor(es) significativamente diferente(s), apesar de sua(s) existência(s) ter(em) sido apontada(s) pelo ANOVA.

A Figura 14 mostra que LAP/IRAP foi maior na FM de C sob ANG IV, em relação à condição basal, insulina, AVP e ANG II. Em LDM e HDM de C não houve modulação, por nenhum

dos peptídeos, de LAP/IRAP. Já na FM de FD, LAP/IRAP foi maior sob ANG IV, em relação à AVP. Em LDM de MSG, a LAP/IRAP foi maior sob insulina, em relação à condição basal. A atividade DPPIV na HDM de MSG sob AVP foi maior que sob ANG IV. Não houve modulação, por nenhum peptídeo, da atividade LAP/IRAP em nenhuma das frações em MSG-FD.

A atividade MetAP (Figura 15) foi maior na FM de C após incubação com ANG IV, em relação à condição basal, insulina, AVP e ANG II. A atividade MetAP sob insulina foi maior na FM de MSG, em relação à ANG IV, enquanto na LDM a MetAP foi maior sob insulina e AVP, em relação à ANG IV. Não houve modulação da MetAP, pelos peptídeos sob estudo, em nenhuma das frações dos grupos FD e MSG-FD.

A Figura 16 mostra que a atividade PSA em FM de C sob ANG IV foi maior que na condição basal, e em HDM sob AVP foi maior que na condição basal e que sob insulina e ANG IV. Em FD não houve modulação da PSA, pelos peptídeos sob estudo, em nenhuma das frações. Na FM de MSG, PSA sob insulina foi maior em relação à condição basal e ANG IV, assim como foi maior a atividade PSA sob ANG II, em relação à condição basal. Já em HDM de MSG-FD, PSA foi maior sob AVP, em relação à condição basal, insulina, ANG II e ANG IV.

A atividade aminopeptidase ácida (APA) não foi detectada em nenhuma das frações incubadas com peptídeos em nenhum dos grupos estudados.

Figura 10. Atividade de aminopeptidase básica (APB) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0164$, LDM $p=0,0122$, HDM $p=0,5976$; FD: FM $p=0,0023$, LDM $p=0,1203$, HDM $p=0,2443$; MSG: FM $p=0,0596$, LDM $p=0,0046$, HDM $p<0,0001$; MSG-FD: FM $p=0,1156$, LDM $p=0,2950$, HDM $p=0,3181$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

C

FD

MSG

MSG-FD

Figura 11. Atividade de aminopeptidase neutra insensível à puromicina (APM) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0,0050$, LDM $p=0,0,1036$, HDM $p=0,1808$; FD: FM $p=0,9126$, LDM $p=0,7116$, HDM $p=0,0849$; MSG: FM $p=0,0203$, LDM $p=0,1885$, HDM $p=0,9527$; MSG-FD: FM $p=0,0136$, LDM $p=0,2546$, HDM $p=0,1016$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

Figura 12. Atividade de cistil aminopeptidase (CAP) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0228$, LDM $p=0,5981$, HDM $p=0,3980$; FD: FM $p=0,0767$, LDM $p=0,1590$, HDM $p=0,1147$; MSG: FM $p=0,0190$, LDM $p=0,0155$, HDM $p=0,0096$; MSG-FD: FM $p=0,1253$, LDM $p=0,0439$, HDM $p=0,5836$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

C

FD

MSG

MSG-FD

Figura 13. Atividade de dipeptidil peptidase IV (DPPIV) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0384$, LDM $p=0,0730$, HDM $p=0,1156$; FD: FM $p=0,3024$, LDM $p=0,3796$, HDM $p=0,0568$; MSG: FM $p=0,0194$, LDM $p=0,0053$, HDM $p=0,1769$; MSG-FD: FM $p=0,0686$, LDM $p=0,0487$, HDM $p=0,5608$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

Figura 14. Atividade de leucil /aminopeptidase regulada por insulina (LAP/IRAP) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0051$, LDM $p=0,2207$, HDM $p=0,1964$; FD: FM $p=0,0253$, LDM $p=0,5478$, HDM $p=0,2523$; MSG: FM $p=0,0777$, LDM $p=0,0401$, HDM $p=0,0580$; MSG-FD: FM $p=0,1918$, LDM $p=0,0688$, HDM $p=0,8390$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

Figura 15. Atividade de metionil aminopeptidase (MetAP) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0002$, LDM $p=0,2746$, HDM $p=0,1895$; FD: FM $p=0,6901$, LDM $p=0,1952$, HDM $p=0,4178$; MSG: FM $p=0,0365$, LDM $p=0,0046$, HDM $p=0,0198$; MSG-FD: FM $p=0,1697$, LDM $p=0,4703$, HDM $p=0,2111$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

Figura 16. Atividade de aminopeptidase neutra sensível à puromicina (PSA) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) pela incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, salina vs insulina vs AVP vs ANG II vs ANG IV: C: FM $p=0,0445$, LDM $p=0,1217$, HDM $p=0,0097$; FD: FM $p=0,1043$, LDM $p=0,09797$, HDM $p=0,1956$; MSG: FM $p=0,0014$, LDM $p=0,1839$, HDM $p=0,2632$; MSG-FD: FM $p=0,8604$, LDM $p=0,3170$, HDM $p=0,0098$. Teste de comparações múltiplas de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes na mesma fração e grupo indicam diferenças significativas entre os estímulos).

5.3.2.2. Tráfego das atividades aminopeptidásicas após estímulos com peptídeos

As Figuras 17 a 23 mostram o perfil das atividades aminopeptidásicas entre as diferentes frações dos adipócitos (FM, LDM ou HDM), em cada situação/tratamento aplicado (C, FD, MSG ou MSG-FD), na situação basal (salina) e sob diferentes estímulos (insulina, AVP, ANG II e ANG IV). As eventuais alterações nos níveis de atividade entre as frações provenientes dos animais sob o mesmo tratamento refletem alterações do tráfego destas atividades de uma a outra destas frações em função do estímulo aplicado ou de sua ausência.

Na Figura 17 observa-se maior atividade APB na FM de adipócitos de MSG-FD na condição basal, em relação à LDM. Sob AVP e ANG IV APB foi maior na FM de FD, em relação à LDM e HDM. Em MSG a APB sob ANG IV foi maior em LDM e HDM, em relação à FM. Não houve diferença da atividade APB entre FM, LDM e HDM de C na situação basal e também após incubação com insulina, AVP, ANG II e ANG IV.

A atividade APM (Figura 18) não apresentou diferenças entre FM, LDM e HDM de todos os grupos, independentemente dos estímulos avaliados.

Não houve alteração de CAP (Figura 19) nas diferentes frações de C na situação basal e após estímulo com AVP e ANG IV. Porém, sob insulina a CAP na FM foi maior em relação à LDM e HDM; CAP sob ANG II foi maior na FM de C, em relação à LDM. Em FD a atividade CAP foi maior na FM, em relação à LDM e HDM, após a incubação com insulina, ANG II e ANG IV; enquanto que sob insulina, CAP foi maior na FM, em relação somente a LDM; mas não houve alteração de CAP nas diferentes frações de FD na condição basal e após incubação com AVP. A atividade CAP foi maior na FM de MSG, em relação à LDM e HDM, na condição basal e assim permaneceu após a incubação com insulina, AVP e ANG II, enquanto que a incubação com ANG IV não alterou a atividade de CAP nas diferentes frações de MSG. O grupo MSG-FD apresentou maior atividade CAP em FM, em relação à LDM e HDM, após incubação AVP e ANG II. A situação basal e as incubações com insulina e ANG IV não alteraram a atividade de CAP nas diferentes frações de MSG-FD.

A Figura 20 mostra que não houve alteração da atividade DPPIV nas diferentes frações de C, na condição basal e após incubações realizadas com os peptídeos sob estudo. A atividade DPPIV na FM foi maior sob insulina, em relação à LDM, em FD. A DPPIV foi maior sob ANG II na FM de MSG, em relação à LDM e HDM, enquanto que sob insulina, a DPPIV foi maior em FM, em relação à HDM. A DPPIV foi maior na FM de MSG-FD, em relação à LDM, na situação basal; a atividade DPPIV sob insulina foi maior na FM de MSG-FD, em relação a HDM, enquanto sob ANG II e ANG IV, a DPPIV foi maior na FM, em relação à LDM e HDM.

A atividade LAP/IRAP foi maior na FM de MSG-FD, em relação à LDM e HDM, na situação basal. A LAP/IRAP sob ANG II foi maior na FM de MSG, em relação à LDM e HDM, enquanto LAP/IRAP sob AVP foi maior em HDM, em relação à FM. Na FM de C e FD a atividade LAP/IRAP foi maior que em LDM e HDM. Não houve alteração da atividade LAP/IRAP nas diferentes frações, nos diferentes grupos, após a incubação com insulina (Figura 21).

Não houve alteração da atividade MetAP nas diferentes frações, nos grupos C, FD e MSG-FD, na situação basal e após a incubação com insulina e ANG IV. Em C, MetAP foi maior em HDM, em relação à FM, após a incubação com AVP; e em LDM, em relação à FM, após a incubação com ANG II. MetAP em HDM de FD foi maior sob ANG II, em relação a FM. Em MSG, MetAP sob AVP foi maior em LDM, em relação à FM; enquanto sob ANG II, MetAP foi maior em LDM e HDM, em relação a FM. A atividade MetAP não sofreu alteração nas diferentes frações de MSG-FD na situação basal e também sob ação de insulina, AVP, ANG II e ANG IV (Figura 22).

A atividade PSA foi maior na LDM de FD, em relação à HDM, na situação basal, enquanto que em MSG-FD a PSA foi maior na FM, em relação à LDM e HDM, após a incubação com ANG II. Não houve alteração da atividade PSA nas diferentes frações, nos diferentes grupos, após incubação com insulina, AVP e ANG IV (Figura 23).

A atividade aminopeptidase ácida (APA) não foi detectada em nenhuma das frações mediante incubações com peptídeos em nenhum dos grupos estudados.

Figura 17. Atividade de aminopeptidase básica (APB) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles saudáveis (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,4152$, FD $p=0,1801$, MSG $p=0,1010$, MSG-FD $p=0,0236$; Insulina: C $p=0,9173$; FD $p=0,3211$, MSG $p=0,2693$, MSG-FD $p=0,1045$; AVP: C $p=0,4629$, FD $p=0,0109$, MSG $p=0,7010$, MSG-FD $p=0,1039$; ANG II: C $p=0,6886$, FD $p=0,5996$, MSG $p=0,2655$, MSG-FD $p=0,3652$; ANG IV: C $p=0,4593$, FD $p=0,0034$, MSG $p=0,0003$, MSG-FD $p=0,1482$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

BASAL (SALINA)

INSULINA

AVP

ANG II

ANG IV

Figura 18. Atividade de aminopeptidase neutra insensível a puromicina (APM) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles saudáveis (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,8010$, FD $p=0,3981$, MSG $p=0,2025$, MSG-FD $p=0,0576$; Insulina: C $p=0,8529$, FD $p=0,6442$, MSG $p=0,1251$, MSG-FD $p=0,0689$; AVP: C $p=0,1119$, FD $p=0,6421$, MSG: $0,6012$, MSG-FD $p=0,2484$; ANG II: C $p=0,3634$, FD $p=0,9934$, MSG $p=0,1802$, MSG-FD $p=0,1260$; ANG IV: C $p=0,0993$, FD $p=0,1710$, MSG $p=0,1062$, MSG-FD $p=0,0812$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

BASAL (SALINA)

INSULINA

AVP

ANG II

ANG IV

Figura 19. Atividade de cistil aminopeptidase (CAP) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais do grupo controles sadios (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,3973$, FD $p=0,1366$, MSG $p=0,0095$, MSG-FD $p=0,035$; Insulina: C $p=0,0031$, FD $p=0,0360$, MSG $p=0,0118$, MSG-FD $p=0,0608$; AVP: C $p=0,1255$, FD $p<0,0001$, MSG $p=0,0073$, MSG-FD $p=0,0055$; ANG II: C $p=0,0122$, FD $p<0,0001$, MSG $p<0,0001$, MSG-FD $p=0,0013$; ANG IV: C $p=0,3413$, FD $p=0,0172$, MSG $p=0,1719$, MSG-FD $p=0,0384$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

BASAL (SALINA)

82

INSULINA

AVP

ANG II

ANG IV

Figura 20. Atividade de dipeptidil peptidase IV (DPPIV) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles saudáveis (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,0809$, FD $p=0,5768$, MSG $p=0,4028$, MSG-FD $p=0,0279$; Insulina: C $p=0,4416$, FD $p=0,0319$, MSG $p=0,0448$, MSG-FD $p=0,0154$; AVP: C $p=0,1867$, FD $p=0,2334$, MSG $p=0,0841$, MSG-FD $p=0,0640$; ANG II: C $p=0,06898$, FD $p=0,0788$, MSG $p<0,0001$, MSG-FD $p=0,0008$; ANG IV: C $p=0,0460$, FD $p=0,0103$, MSG $p=0,0785$, MSG-FD $p=0,0050$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

BASAL (SALINA)

INSULINA

AVP

ANG II

ANG IV

Figura 21. Atividade de leucil aminopeptidase regulada por insulina (LAP/IRAP) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles sadios (C), controles privado de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,5125$, FD $p=0,7072$, MSG $p=0,6882$, MSG-FD $p=0,0109$; Insulina: C $p=0,8962$, FD $p=0,2894$, MSG $p=0,2511$, MSG-FD $p=0,3433$; AVP: C $p=0,2166$, FD $p=0,8534$, MSG $p=0,0057$, MSG-FD $p=0,4916$; ANG II: C $p=0,1528$, FD $p=0,0860$, MSG $p=0,0002$, MSG-FD $p=0,0823$; ANG IV: C $p=0,0117$, FD $p=0,0190$, MSG $p=0,1339$, MSG-FD $p=0,1360$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

BASAL (SALINA)

INSULINA

AVP

ANG II

ANG IV

Figura 22. Atividade de metionil aminopeptidase (MetAP) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles saudáveis (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,0609$, FD $p=0,9942$, MSG $p=0,1227$, MSG-FD $p=0,7908$; Insulina: C $p=0,1811$, FD $p=0,0773$, MSG $p=0,0870$, MSG-FD $p=0,8732$; AVP: C $p=0,0484$, FD $p=0,5463$, MSG $p=0,0025$, MSG-FD $p=0,4061$; ANG II: C $p=0,0222$, FD $p=0,0224$, MSG $p=0,0022$, MSG-FD $p=0,9616$; ANG IV: C $p=0,2164$, FD $p=0,0475$, MSG $p=0,1293$, MSG-FD $p=0,5899$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

Figura 23. Atividade de aminopeptidase neutra sensível à puromicina (PSA) nas frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal de animais controles saudáveis (C), controles privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) após incubação com salina, insulina, vasopressina (AVP), angiotensina II (ANG II) e IV (ANG IV). Valores são média $\pm$ EPM de amostras individuais de N animais (N mostrado entre parênteses sobre as barras). ANOVA, FM vs LDM vs HDM: Basal: C $p=0,9225$, FD $p=0,0268$, MSG $p=0,3358$, MSG-FD $p=0,7361$; Insulina: C $p=0,8396$, FD $p=0,1782$, MSG $p=0,2805$, MSG-FD $p=0,3347$; AVP: C $p=0,0440$, FD $p=0,6936$, MSG $p=0,4913$, MSG-FD $p=0,4019$; ANG II: C $p=0,5974$, FD $p=0,8298$, MSG $p=0,2272$, MSG-FD $p<0,0001$; ANG IV: C $p=0,3098$, FD $p=0,6371$, MSG $p=0,5636$; MSG-FD $P=0,2911$; teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$, letras diferentes no mesmo grupo e estímulo indicam diferenças significativas).

BASAL (SALINA)

INSULINA

AVP

ANG II

ANG IV

5.3. Expressão gênica

A Figura 24 mostra a expressão gênica relativa das enzimas APA, APB, APM, CAP/LAP/IRAP, DPPIV, MetAP e PSA em adipócitos isolados. Não houve diferença na expressão gênica da APA, APM, CAP/LAP/IRAP e PSA entre os diferentes grupos. Os grupos FD e MSG-FD apresentaram maior expressão gênica da APB em relação à C e MSG. A expressão gênica de DPPIV e MetAP foi maior em MSG-FD, em relação à MSG.

Figura 24. Expressão gênica relativa das aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), neutra insensível à puromicina (APM), cistil/leucil/aminopeptidase regulada por insulina (CAP/LAP/IRAP), dipeptidil peptidase IV (DPPIV), metionil (MetAP) aminopeptidase e aminopeptidase neutra sensível à puromicina (PSA) em adipócitos isolados. Número de animais entre parênteses sobre as barras. ANOVA, C vs FD vs MSG vs MSG-FD: APA $p=6982$, APB $p=0,0007$, APM $p=0,3781$, CAP/IRAP $p=0,2098$, DPPIV $p=0,0179$, MetAP $p=0,0148$, PSA $p=0,2282$; teste de comparação múltipla de Tukey, $p<0,05$: (letras diferentes indicam diferença significativa da expressão gênica de uma mesma enzima entre os grupos animais).

Tabela 3. Sumário das alterações da atividade catalítica e expressão gênica de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), neutra insensível à puromicina (APM), cistil/leucil/aminopeptidase regulada por insulina (CAP/LAP/IRAP), dipeptidil peptidase IV (DPPIV), metionil (MetAP) aminopeptidase e aminopeptidase neutra sensível à puromicina (PSA) de frações de membrana plasmática (FM) e de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microsomal de adipócitos de animais normais privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD) em relação a controles sadios.

		FD			MSG			MSG-FD		
		FM	LDM	HDM	FM	LDM	HDM	FM	LDM	HDM
APA	Expressão gênica	=			=			=		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
APB	Expressão gênica	↑			=			↑		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
APM	Expressão gênica	=			=			=		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
CAP	Expressão gênica	-			-			-		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
DPPIV	Expressão gênica	=			=			=		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
LAP/IRAP	Expressão gênica	=			=			=		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
MetAP	Expressão gênica	=			=			=		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	=	=	=	=	=
PSA	Expressão gênica	=			=			=		
	Atividade enzimática	=	=	=	=	↑	=	=	=	=

As setas indicam o sentido das alterações da atividade catalítica e da expressão gênica.

Tabela 4. Sumário das alterações na modulação e na localização das atividades catalíticas de aminopeptidase básica (APB), neutra insensível à puromicina (APM), cistil/leucil/aminopeptidase regulada por insulina (CAP/LAP/IRAP), dipeptidil peptidase IV (DPPIV), metionil (MetAP) aminopeptidase e aminopeptidase neutra sensível à puromicina (PSA) após incubação com insulina (I), vasopressina (AVP), angiotensina (ANG) II e ANG IV.

		C			FD			MSG			MSG-FD		
		FM	LDM	HDM	FM	LDM	HDM	FM	LDM	HDM	FM	LDM	HDM
A P B	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	↑	-	=
	I	=	=	=	=	=	=	↑	=	↑	=	=	=
	AVP	=	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	↑	=
	ANGII	=	=	=	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=
	ANGIV	↑	↑	=	↑	=	=	↓	=	=	=	=	=
A P M	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	=	-	=
	I	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=
	AVP	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	=	=
	ANGII	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	=	=
	ANGIV	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
C A P	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	↑	-	=
	I	↑	=	=	↑	=	=	↑	=	=	=	=	=
	AVP	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	↑	=	=
	ANGII	↑	=	=	↑	=	=	↑	=	=	↑	=	=
	ANGIV	=	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
D P P IV	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	↑	-	=
	I	=	=	=	↑	=	=	↑	↑	=	=	=	=
	AVP	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	ANGII	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	↑	=	=
	ANGIV	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=
LAP/ IRAP	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	↑	-	=
	I	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=
	AVP	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	ANGII	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=
	ANGIV	↑	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
M e t A P	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	=	-	=
	I	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	AVP	=	=	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	=
	ANGII	↓	=	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	=
	ANGIV	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
P S A	BASAL	=	-	=	=	-	=	=	-	=	=	-	=
	I	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=
	AVP	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
	ANGII	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	↑	=	=
	ANGIV	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

As setas indicam o sentido das alterações de uma mesma atividade catalítica numa mesma fração (fração de membrana plasmática – FM, frações de baixa – LDM e alta – HDM densidade microssomal) de adipócitos isolados de um mesmo grupo (controle sadio – C, controle sadio privado de alimento – FD, obeso – MSG, obeso privado de alimento – MSG-FD) mediante a ação dos peptídeos **em relação à situação basal** (incubação com salina) (**MODULAÇÃO - em vermelho**) e **em relação à LDM (LOCALIZAÇÃO - em azul)**. A atividade aminopeptidase ácida (APA) não foi detectada nas frações incubadas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Parâmetros biométricos, lipócrito e diâmetro médio e concentração de adipócitos.

Os valores dos parâmetros biométricos (massa corporal, índice de Lee, comprimento nasoanal, massa dos depósitos de gordura periepídidimal e retroperitoneal) aqui obtidos são similares aos relatados na literatura (ALPONTI & SILVEIRA 2010, ALPONTI *et al.* 2011a,b,c). A massa corporal e o comprimento nasoanal menores que nos animais controle são as características típicas mais conhecidas do modelo experimental de obesidade induzida por MSG. Em animais obesos MSG ocorre um decréscimo na secreção de GH (BLOCH *et al.* 1984, SHAPIRO *et al.* 1986), justificando o menor comprimento nasoanal. O maior índice de Lee dos obesos MSG e MSG-FD reflete a maior adiposidade destes animais em relação ao tamanho, comparativamente aos animais normais.

Os depósitos de gordura são classificados de acordo com a sua localização topográfica. São duas grandes subdivisões: depósitos subcutâneos e depósitos internos, cada um deles apresentando outras subdivisões. Os dois depósitos de gordura avaliados no presente estudo (periepídidimal e retroperitoneal) são classificados como depósitos internos e viscerais, sendo o depósito retroperitoneal um depósito extraperitoneal intraabdominal, e o depósito periepídidimal um depósito extraperitoneal intrapélvico (YANG 2008). Os diferentes depósitos de gordura possuem características diferentes, não somente relacionadas ao metabolismo celular, mas também quanto a sua capacidade de formar novos adipócitos (CINTI 2005, GIL *et al.* 2011, CINTI 2012). A distribuição regional da gordura corporal é conhecida como um importante indicador de alterações metabólicas e cardiovasculares em alguns indivíduos (YANG 2008, GIL *et al.* 2011). O depósito de gordura periepídidimal dos obesos MSG, privados ou não de alimento, não apresenta diferença em sua massa em relação aos controles, privados ou não de alimento (ALPONTI & SILVEIRA 2010). O presente estudo mostrou que o depósito de gordura retroperitoneal dos obesos MSG, privados ou não de alimento, apresenta maior massa e, além disso, os adipócitos dos obesos MSG, privados ou não de alimento, apresentam maior diâmetro e maior lipócrito em relação aos adipócitos de animais controles. Por outro lado, este depósito dos obesos MSG não apresenta diferença no número de adipócitos em relação aos animais controles. Estes dados, juntamente com a análise do índice de Lee, evidenciam claramente outra característica desse modelo, que é a hipertrofia adipocítica (BERNARDIS & PATTERSON 1968, MACHO *et al.* 2000).

O aumento do lipócrito (medida do volume ocupado pelos adipócitos em relação ao volume total de um capilar de hematócrito) (FINE & DiGIROLAMO 1997) pode ser devido ao aumento no diâmetro da célula (hipertrofia), que passará a ocupar mais espaço, ou devido ao aumento no número

de adipócitos (hiperplasia), processo chamado adipogênese. A adipogênese é a diferenciação de células tronco mesenquimais, presentes no estroma do tecido adiposo, em pré-adipócitos. Isso se dá quando essas células multipotentes perdem a habilidade de se diferenciarem em outras linhagens mesenquimais e tornam-se comprometidas com a linhagem adipocitária (QUEIROZ *et al.* 2009). Depois do comprometimento com a linhagem adipocitária, os pré-adipócitos se tornam adipócitos maduros, acumulando gotas lipídicas e apresentando a habilidade de responder a hormônios (QUEIROZ *et al.* 2009). Apesar de todo o conhecimento que existe sobre adipogênese (CINTI 2005, QUEIROZ *et al.* 2009, CINTI 2012), ainda há dúvidas sobre a existência desse processo *in vivo* justificada pela falta de uma metodologia padronizada para monitorar esse evento (QUEIROZ *et al.* 2009). No entanto, no presente estudo observou-se um aumento do número de células na suspensão celular dos animais normais privados de alimento, acompanhado de diminuição do diâmetro das células e aumento no lipócrito em relação aos demais grupos (obesos, privados ou não de alimento, e controles sadios). Esse resultado é confirmado pelo outro método utilizado no presente trabalho para determinação do número de células, dado pela razão entre massa total do tecido adiposo utilizado para o isolamento das células (3g) e massa do adipócito, o qual resultou em valores na mesma ordem de magnitude e com diferenças estatísticas similares ao observado pelo método anterior. Esses resultados sugerem que a associação da medida do lipócrito e do volume médio dos adipócitos fornece uma estimativa confiável do número de adipócitos na suspensão celular. No caso da privação alimentar em particular, a alteração no número de adipócitos, calculados pelo lipócrito e pela razão entre a massa total de tecido adiposo/massa do adipócito, sugere a ocorrência de adipogênese, a qual é provavelmente uma resposta homeostática à lipólise durante a privação alimentar e um ajuste para proporcionar um aumento da armazenagem de energia quando houver um novo fornecimento de alimento.

6.2. Caracterização de atividades peptidásicas nas frações de membrana e de alta e baixa densidade microsomal de adipócitos isolados

O presente estudo está relatando pela primeira vez a presença de atividades APA, APB, APM, CAP, DPPIV, MetAP e PSA em adipócitos. Por isso, a necessidade de estabelecer condições ideais de ensaio destas atividades por meio da estimativa dos parâmetros cinéticos básicos, ainda que em material bruto da mistura das três frações subcelulares sob estudo. A APM foi a atividade com maior V_{max} (cerca de 60 vezes em relação à APA, atividade com menor V_{max}) e com maior eficiência catalítica. Tal resultado fica ainda mais evidente quando analisada a distribuição das atividades catalíticas sob estudo em cada uma das frações dos diferentes grupos animais, assim

observando-se a predominância da APM nas frações microssomais nos diferentes grupos animais (FD: HDM; MSG: LDM). APA foi a enzima com maior afinidade pelo substrato (menor Km).

6.3. Aminopeptidases

6.3.1. Quantificação da atividade catalítica basal *in vivo* e expressão gênica das aminopeptidases nas frações de membrana plasmática e de alta e baixa densidade microssomal.

O envolvimento das aminopeptidases na fisiologia do adipócito ainda é pouco conhecido. A única aminopeptidase até o momento descrita em adipócito (IRAP), com reconhecido envolvimento no metabolismo energético (JORDENS *et al.* 2010), é conhecida por estar localizada, no estado basal (sem estímulo por insulina), na fração de baixa densidade microssomal. Como mencionado anteriormente, sabe-se que sob estimulação pela insulina, AVP, OXT e exercício físico, a vesícula contendo IRAP transloca da fração de baixa densidade microssomal para a fração de membrana plasmática (HERBST *et al.* 1997, NAKAMURA *et al.* 2000, KELLER 2004).

Muitos dos peptídeos envolvidos na regulação do metabolismo energético são substratos das aminopeptidases aqui estudadas, o que destaca a importância dessa classe de enzimas, visto que alterações dessas atividades em distúrbios relacionados ao controle energético devem repercutir em alterações nos níveis destes peptídeos suscetíveis. Sabe-se que a atividade PSA está presente no proteassoma (HATTORI & TSUJIMOTO 2004), o qual é responsável pela apresentação de antígenos ao complexo MHC (SARIC *et al.* 2001, HATTORI & TSUJIMOTO 2004). Em indivíduos obesos, seu aumento na fração de baixa densidade microssomal (onde estão os proteassomas) (BROOKS *et al.* 2000) deve então afetar o sistema imune. Sabe-se que um sistema angiotensina parácrino local influencia a sensibilidade à insulina e a diferenciação do tecido adiposo (WEILAND & VERSPOHL 2009). A APA atua na ANG II, formando a ANG III (JOHNSON *et al.* 1984, MARTÍNEZ-MARTOS *et al.* 2011). Nos animais obesos e saudáveis, ambos privados de alimento, não foi detectada atividade APA, o que acentuaria o estresse metabólico nesses animais, visto que a ausência de APA e o aumento de ANG II favoreceriam a lipogênese e não a lipólise, que nesse caso é essencial para o fornecimento de substrato energético imprescindível para a manutenção de processos fisiológicos essenciais já prejudicados pela privação alimentar. Pouco se conhece sobre a relação da MetAP com o metabolismo energético. Porém, a MetAP é responsável pela remoção do aminoácido metionina da porção N-terminal de proteínas recém sintetizadas, facilitando sua translocação a partir dos ribossomos (MAURIZ *et al.* 2010). A diminuição dessa atividade aqui

observada na fração de microsomos de alta densidade nos obesos privados de alimento, em relação aos obesos, permite hipotetizar que nesta situação ocorra um dano na maquinaria responsável pela facilitação da translocação de proteínas para o citoplasma ou membrana celular, provavelmente uma inibição da atividade catalítica.

As discrepâncias observadas entre o sentido das alterações de expressão gênica e de atividades catalíticas para todas as principais proteínas a que se atribuem tais atividades (APA: EC 3.4.11.7, APB: EC 3.4.11.6, APM: EC 3.4.11.2, LAP/CAP/IRAP: EC 3.4.11.3, DPPIV: EC 3.4.14.5, MetAP: EC 3.4.11.18 e PSA: EC 3.4.11.14) devem ser consequência de diferenças nos processos regulatórios que incluem a própria transcrição gênica, a ativação ou a supressão da tradução do mRNA e também de vias de sinalização, além de fatores epigenéticos influenciando o controle da expressão proteica e de sua função enzimática após a expressão gênica (MCNURLAN 2012). Uma ulterior análise da expressão proteica deverá ser realizada para avaliar esta última hipótese. A proteína EC 3.4.14.5 (DPPIV) teve um aumento da sua expressão gênica em indivíduos obesos privados de alimento. Foi observado também o aumento da expressão gênica para a proteína EC 3.4.11.6 (APB) nos animais normais e obesos, ambos privados de alimento, bem como a diminuição da expressão gênica para a proteína EC 3.4.11.18 (MetAP) nos animais obesos privados de alimento. Não houve alteração da expressão gênica para as proteínas EC 3.4.11.7, EC 3.4.11.2, EC 3.4.11.3 e EC 3.4.11.14. Em todos esses casos, além dos fatores supracitados, a discrepância entre a expressão gênica e a atividade enzimática também pode significar que as proteínas codificadas possam exercer outras funções não enzimáticas, como a de receptor; por exemplo, a EC 3.4.11.2 também pode atuar como receptor de coronavírus e a EC 3.4.11.3 como receptor da ANG IV (CHEN *et al.* 2012, NIKOLAOU *et al.* 2013).

6.3.2. Varredura da influência, *in vitro*, de peptídeos representativos para o tráfego e modulação das atividades aminopeptidásicas do adipócito.

A sinalização em resposta a um peptídeo ou hormônio desencadeia uma série de respostas na célula, entre elas a síntese e secreção de novas proteínas, e também o transporte de vesículas contendo proteínas do meio intracelular para a fração de membrana plasmática. O deslocamento da vesícula contendo o GLUT4 para a membrana plasmática, após a sinalização pela insulina, é um exemplo clássico de tal transporte, denominado translocação (WATSON & PESSIN 2001, DUCLUZEAU *et al.* 2002, HOU & PESSIN 2007, ZEYDA & STULNIG 2009, JORDENS *et al.* 2010, DIMITRIADIS *et al.* 2011). Os dados obtidos no presente estudo sugerem o papel da insulina,

AVP, ANG II e ANG IV na modulação e tráfego de atividades aminopeptidásicas do adipócito nas diferentes situações estudadas.

Como mencionado anteriormente, vários dados da literatura relatam a translocação da IRAP da fração de microssomos de baixa densidade para a membrana plasmática após incubação com insulina em animais saudáveis, o que permitiria a essa enzima o desempenho de sua função catalítica ou de receptor (KELLER *et al.* 1995, KELLER *et al.* 2002, KELLER 2004, ALBISTON *et al.* 2010, JORDENS *et al.* 2010, BOGAN 2012). A maioria dos relatos da literatura neste sentido avalia esta translocação por *immunoblot* ou imunofluorescência e não pela medida de atividade enzimática (JORDENS *et al.* 2010, HIRATA *et al.* 2011, BOGAN 2012) e nos casos em que esta medida de atividade é feita, geralmente o substrato utilizado tem o N-terminal Leu (LEW *et al.* 2003, SANÍNGER *et al.* 2011). Porém, os dados obtidos no presente trabalho mostram apenas uma tendência, sem significância estatística, para a ocorrência dessa translocação da atividade LAP (IRAP), pela insulina, nos animais controles saudáveis. No entanto, a insulina promoveu o tráfego da atividade CAP (IRAP) (ROGI *et al.* 1996, NAGAKASA *et al.* 1997, PILAR *et al.* 2006) da fração de baixa densidade microssomal para a fração de membrana plasmática nos animais saudáveis privados ou não de alimento e nos obesos. Assim, essa ineficiência da insulina em translocar a atividade LAP/IRAP (atividade de hidrólise do substrato sintético Leu- β -naftilamida) e sua eficiência em translocar a atividade CAP/IRAP (atividade de hidrólise do substrato sintético L-Cys-di- β -naftilamida) da fração de baixa densidade microssomal sugerem uma especificidade notavelmente maior da enzima conhecida como IRAP pelo N-terminal Cys, diferentemente do conceito corrente. A ANG II também parece regular a atividade CAP, cujo substrato (AVP) tem sua secreção estimulada nos adipócitos pela conversão de ANG II em ANG III. Isto porque a ANG II promove a translocação da atividade CAP da fração de baixa densidade microssomal para a membrana plasmática nos animais controles e obesos privados ou não de alimento e a AVP também promove essa mesma translocação de CAP para a fração de membrana plasmática nos animais obesos, privados ou não de alimento. O presente estudo mostra que, apesar de não ser modulada pela insulina, a atividade LAP/IRAP é modulada (aumentada) pela ANG IV na fração de membrana plasmática dos animais normais, privados ou não de alimento, em relação ao estado basal (salina). A ANG IV também promove a translocação da atividade LAP/IRAP da fração de baixa densidade microssomal para a fração de membrana plasmática. Dados da literatura mostram que a IRAP é receptora de ANG IV, a qual bloqueia a atividade catalítica dessa enzima (HALLBERG 2009, ALBISTON *et al.* 2010). Essa interação no SNC é acompanhada de um potente efeito benéfico sobre a memória (HALLBERG 2009, ALBISTON *et al.* 2010). Por analogia, nos adipócitos a interação da ANG IV com seu receptor IRAP provavelmente causaria a transdução de sinais, interagindo com proteínas

citoplasmáticas. Além da ANG IV, a ANG II também promove a translocação da atividade LAP/IRAP da fração de microssomos de alta e baixa densidade para a fração de membrana plasmática nos obesos. A ANG II é um precursor da ANG III (um dos substratos da LAP/IRAP) e sabe-se que está aumentada em obesos (RUSTER & WOLF 2013). É notável, então, pelos resultados do presente estudo, a distinção possível entre a modulação preferencial de CAP/IRAP por insulina e de LAP/IRAP por ANG II e IV. Por sua vez, o tráfego da atividade MetAP dos animais normais e obesos também é afetado pela ANG II, o que deve refletir na prevalência dessa atividade nas frações microssomais (a atividade MetAP foi maior nas frações microssomais, em relação a fração de membrana plasmática). A ANG IV modula (aumentando), nos animais normais, a atividade MetAP na fração de membrana plasmática em relação ao basal (incubação com salina), sugerindo que a ANG IV poderia regular a ação hidrolítica dessa enzima sobre peptídeos no meio extracelular. A AVP e a ANG IV promovem o tráfego da atividade APB da fração microssomal de baixa densidade para a fração de membrana plasmática nos animais sadios privados de alimento, enquanto a ANG IV e ANG II modulam (aumentando) a atividade APB nos controles privados ou não de alimento e nos obesos, respectivamente, na fração de membrana plasmática e na fração de baixa densidade microssomal e, assim, influenciariam a funcionalidade da APB, respectivamente na degradação e/ou na maturação de peptídeos. Nos animais controles, a ANG IV modula (aumentando) as atividades APM e PSA, em relação ao basal (incubação com salina). Esse peptídeo é o produto da hidrólise da ANG III por essas enzimas, sugerindo uma regulação positiva dessas atividades pelo produto da hidrólise. A insulina modula (aumentando) a atividade de APM e PSA nos animais obesos, em relação ao basal (incubação com salina), sugerindo seu papel na regulação da hidrólise de substratos dessas enzimas, como a ANG III. A atividade DPPIV na fração de membrana plasmática e de microssomos de baixa densidade dos animais obesos é modulada (aumentada) pela insulina, enquanto sua translocação da fração de baixa densidade microssomal para a fração de membrana plasmática nesses mesmos animais é promovida pela ANG II.

7. CONCLUSÕES

A proposição de que a obesidade hipotalâmica e a privação alimentar podem afetar as aminopeptidases e sua interação com peptídeos relacionados no adipócito foi aqui demonstrada de forma original e inédita pelas seguintes constatações experimentais:

- Existem atividades catalíticas de APA, APB, APM, DPPIV, MetAP e PSA e expressão dos genes que codificam as proteínas mais conhecidas por apresentar tais atividades, quais sejam EC 3.4.11.7 (APA), EC 3.4.11.6 (APB), EC 3.4.11.2 (APM), EC 3.4.14.5 (DPPIV), EC 3.4.11.18 (MetAP) e EC 3.4.14.5 (PSA) distribuídas em diferentes compartimentos subcelulares (fração de membrana plasmática e de baixa e alta densidade microssomal) no adipócito;
- Há heterogeneidade dos padrões de distribuição de todas as atividades aminopeptidásicas sob estudo, assim como da expressão gênica para as proteínas EC 3.4.11.6 (APB), EC 3.4.14.5 (DPPIV) e EC 3.4.11.18 (MetAP) em função das situações de obesidade hipotalâmica (modelo adipocitário hipertrófico e normoplásico) e privação alimentar (modelo hipotrófico e hiperplásico), quando avaliadas comparativamente aos animais saudáveis, mostrando a evidente relação destas aminopeptidases do adipócito com alterações do balanço energético nestas situações;
- Dentre as novas aminopeptidases detectadas no adipócito não há nenhuma que se enquadre no conceito clássico de IRAP. As atividades APM, DPPIV e PSA são influenciadas da insulina, ou seja, neste sentido podem ser também consideradas como “reguladas” pela insulina, embora não sofram translocação mediada por esta. Logo, trazem à tona a necessidade de rever o conceito clássico de IRAP, o qual se restringe à ação da insulina somente na regulação da translocação. Insulina e AVP são estímulos para a translocação de CAP, a ANG II estimula a translocação de CAP, DPPIV e LAP/IRAP, enquanto a ANG IV estimula a translocação de LAP/IRAP, todas no sentido das frações microssomais (LDM e HDM) para a fração de membrana plasmática dos adipócitos e em todas as situações (insulina em C, FD e MSG; AVP em MSG e MSG-FD; ANG II-CAP em C, FD, MSG e MSG-FD; ANG II-DPPIV em MSG e MSG-FD; ANG II-LAP/IRAP em MSG; ANG IV em C e FD) aqui estudadas;
- A ANG IV, juntamente com a AVP e a ANG II são os principais moduladores das novas atividades aminopeptidásicas do adipócito aqui reveladas. ANG IV modula as atividades APB, APM, DPPIV, LAP/IRAP, MetAP e PSA na fração de membrana plasmática em

animais sadios e, também, APB na fração de membrana plasmática de animais sadios privados de alimento; ANG II modula as atividades APB e PSA em todas as frações estudadas em obesos; e AVP modula APM e PSA nas frações de membrana plasmática e de alta densidade microssomal em animais obesos privados de alimento.

Figura 25. Desenho esquemático das principais alterações observadas no adipócito quanto a atividade catalítica (— — —) e seu tráfego (— — —) e modulação por vasopressina (AVP, ———), angiotensina II (ANG II, ———) e angiotensina IV (ANG IV, ———) em animais saudáveis (C), animais saudáveis privados de alimento (FD), obesos (MSG) e obesos privados de alimento (MSG-FD). A ausência de APA em FD e MSG-FD prejudicaria esses animais, visto que a preservação de ANG II favorece a lipogênese. Em MSG-FD, a diminuição da atividade MetAP prejudicaria a translocação, a partir dos ribossomos, de proteínas recém-sintetizadas. Em MSG, o aumento da PSA deve estar relacionado com a atividade do proteossoma, afetando o sistema imune. Insulina e AVP são estímulos para a translocação de CAP, a ANG II estimula a translocação de CAP, DPPIV e LAP/IRAP e a ANG IV estimula a translocação de LAP/IRAP das frações de baixa (LDM) e alta (HDM) densidade microssomal para a fração de membrana plasmática (FM) dos adipócitos, em C, FD, MSG e MSG-FD. ANG IV modula as atividades APB, APM, DPPIV, LAP/IRAP, MetAP e PSA em FM e LDM em animais saudáveis e também APB em FM de animais saudáveis privados de alimento. ANG II modula as atividades APB e PSA em FM, LDM e HDM em obesos. AVP modula APM e PSA em FM e HDM em animais obesos privados de alimento.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas para o estudo da regulação endócrina do adipócito nos seguintes aspectos:

- influência de aminopeptidases em processos relevantes para o tecido adiposo, como lipólise e lipogênese, visto que muitos dos peptídeos substratos dessas enzimas são de fundamental importância para os processos citados;
- papel das aminopeptidases na regulação da síntese e processamento de proteínas nas diferentes frações subcelulares dos adipócitos;
- modulação de aminopeptidases adipocíticas por outros peptídeos e citocinas, como neuropeptídeo Y, glucagon-símile tipo 1, ANG III, BK, OXT, interleucinas, TNF- α , os quais, além de serem substratos das aminopeptidases, também têm papel importante na regulação de processos fisiológicos no tecido adiposo.

9. RESUMO

A descoberta de aminopeptidase regulada por insulina (IRAP), a qual hidrolisa peptídeos como ocitocina e vasopressina e é receptora de angiotensina IV, destaca a importância do estudo do envolvimento de peptidases na função endócrina do adipócito. Estudos recentes detectaram alterações das atividades de aminopeptidase neutra e de dipeptidil peptidase IV (DPPIV) no plasma e no hipotálamo e hipocampo na obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG). A presente tese propôs (i) a existência de atividades aminopeptidásicas ácida (APA), básica (APB), neutra insensível (APM) e sensível à puromicina (PSA), metionil (MetAP) e DPPIV, além da já conhecida (leucil (LAP)/cistil (CAP)/IRAP), nas frações de membrana plasmática (FM) e de alta (HDM) e baixa (LDM) densidade microssomal de adipócitos isolados do depósito de gordura retroperitoneal; (ii) que suas atividades catalíticas, expressões gênicas e tráfego subcelular seriam diferenciados entre obesos induzidos por MSG, submetidos ou não à privação alimentar e em animais controle saudáveis, submetidos ou não a privação alimentar; (iii) e influenciadas por insulina, angiotensina II, angiotensina IV e vasopressina. A existência de todas essas aminopeptidases no adipócito foi demonstrada, sendo a APM a que apresenta maior V_{max} e maior eficiência catalítica e a APA a maior afinidade. Os animais obesos apresentaram aumento do diâmetro médio dos adipócitos e aumento do lipócrito, caracterizando hipertrofia adipocítica, enquanto os controles privados de alimento tiveram um aumento no número de adipócitos e aumento no lipócrito, caracterizando hiperplasia adipocítica. Pela primeira vez, um perfil variado de atividades aminopeptidásicas distribuídas em diferentes compartimentos subcelulares do adipócito é evidenciado juntamente com a demonstração de diferenças no padrão de distribuição destas atividades entre os ratos obesos e saudáveis, privados ou não de alimento. Dentre as novas aminopeptidases detectadas no adipócito não há nenhuma com a característica clássica de IRAP. No geral, as alterações das atividades catalíticas nas diferentes situações sob estudo mostram o envolvimento dessas novas aminopeptidases na regulação endócrina do balanço energético (provavelmente via ação hidrolítica sobre angiotensina II e vasopressina) sob modulação por angiotensina IV (APB, APM, DPPIV, LAP/IRAP, MetAP e PSA em animais controle saudáveis e APB em animais controle privados de alimento), angiotensina II (APB e PSA nos animais obesos) e vasopressina (APB nos animais obesos privados de alimento; e influenciadas em seu tráfego subcelular por angiotensina II (CAP, DPPIV e LAP/IRAP) e angiotensina IV (LAP/IRAP). O tráfego subcelular da conhecida atividade CAP/IRAP mostrou-se suscetível à insulina e vasopressina.

Palavras-chave: peptídeos, peptidases, obesidade, privação alimentar, adipócito, modelo animal

10. ABSTRACT

The discovery of insulin-regulated aminopeptidase (IRAP), which hydrolyzes peptides such as oxytocin and vasopressin and is an angiotensin IV receptor, highlights the importance of the involvement of peptidases in the endocrine function of adipocyte. Recent studies have detected changes in aminopeptidase activities of neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) in the plasma and in the hypothalamus and hippocampus of rats with obesity induced by monosodium glutamate (MSG). The present thesis proposes (i) the existence of acid (APA), basic (APB), neutral insensitive (APM) and puromycin sensitive (PSA) aminopeptidases, methionyl aminopeptidase (MetAP) and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), besides the well-known cystyl (CAP) / leucine aminopeptidase (LAP) / IRAP in plasma membrane (MF) and in high (HDM) and low (LDM) density microsomes of isolated adipocytes from retroperitoneal fat pad; (ii) that their catalytic activities, gene expression and subcellular trafficking were different among MSG-induced obese and healthy control rats (food deprived or not); (iii) and influenced by insulin, angiotensin II and IV, and vasopressin. The existence of all these adipocyte aminopeptidases was demonstrated. APM has a highest V_{max} and catalytic efficiency, while APA has a highest substrate affinity. The obese animals have increased mean diameter of adipocytes and lipocrit, characterizing hypertrophy, while the food deprived rats had an increased number of adipocytes and lipocrit, characterizing hyperplasia. For the first time, a profile of varied aminopeptidases activities distributed in different subcellular compartments of adipocyte is evidenced together with the demonstration of differences in the distribution pattern of these activities among the obese and healthy rats, food deprived or not. Among these novel aminopeptidases detected in adipocytes there is no one with the classical characteristic of IRAP. In general, changes on catalytic activities in these different situations show the involvement of these novel aminopeptidases in the endocrine regulation of energy balance (probably via hydrolytic action on angiotensin II and vasopressin) under modulation by angiotensin IV (APB, APM, DPPIV, LAP/IRAP, MetAP and PSA in healthy animals and APB in food deprived healthy animals), by angiotensin II (APB and PSA in obese) and by vasopressin (APB in food deprived obese animals); and under influence of by angiotensin II (CAP, DPPIV, LAP/IRAP) and angiotensin IV (LAP/IRAP) on their subcellular trafficking. Subcellular trafficking of the well-known CAP/IRAP was susceptible to insulin and vasopressin.

Keywords: peptides, peptidases, obesity, food deprivation, adipocyte, animal model

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT CA, YU DM, WOOLLATT E, SUTHERLAND GR, MCCAUGHAN GW, GORRELL MD. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem* 267: 6140-50, 2000.
- ADAM CL, FINDLAY PA, KYLE CE, YOUNG P, MERCER JG. Effect of chronic food restriction on pulsatile luteinizing hormone secretion and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in castrate male sheep. *J Endocrinol* 152(2):329-37, 1997.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTERS P. *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed editora, 659-710, 2004.
- ALBISTON AL, FERNANDO RN, YEATMAN HR, BURNS P, NQ L, DASWANI D, DIWARKARLA S, PHAM V, CHAI SY. Gene knockout of insulin-regulated aminopeptidase: Loss of the specific binding for angiotensin IV and age-related deficit in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 93: 19-30, 2010.
- ALBISTON AL, PECK GR, YEATMAN HR, FERNANDO R, YE S, CHAI SY. Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: heads and tails? *Pharmacol Ther*. 116(3):417-27, 2007.
- ALPONTI RF, SILVEIRA PF. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activities in plasma of monosodium glutamate obese and food deprived rats. *Obesity* 18: 1312-7, 2010.
- ALPONTI RF, FREZZATTI R, BARONE JM, ALEGRE VS, SILVEIRA PF. Dipeptidyl peptidase IV in the hypothalamus and hippocampus of monosodium glutamate obese and food deprived rats. *Metabolism* 60: 234-42, 2011a.
- ALPONTI RF, NOGUEIRA MI, MENDES MT, DE ABREU C, SILVEIRA PF. APM/CD13 and FOS in the hypothalamus of monosodium glutamate obese and food deprived rats. *Regul Pept*. 166: 98-104, 2011b.
- ALPONTI RF, NOGUEIRA MI, SILVEIRA PF. Hypothalamic dynamics of CD26 protein in obese and fasted rats. *J Endocrinol Metab* 1: 70-86, 2011c.
- ANDERSSON H, DEMAEGDT H, VAUQUELIN G, LINDEBERG G, KARLÉN A, HALLBERG M. Ligands to the (IRAP)/AT4 receptor encompassing a 4-hydroxydiphenylmethane scaffold replacing Tyr(2). *Bioorg Med Chem*, 16: 6924-35, 2008.
- ARRUDA AP, MILANSKI M, COOPE A, TORSONI AS, ROPELLE E, CARVALHO DP, CARVALHEIRA JB, VELLOSO LA. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* 152: 1314-26, 2011.
- AXELROD L, MINNICH AK, RYAN CA. Stimulation of prostacyclin production in isolated rat adipocytes by angiotensin II, vasopressin, and bradykinin: evidence for two separate mechanisms of prostaglandin synthesis. *Endocrinology* 116: 2548-53, 1985.
- AXEN A, LINDEBERG G, DEMAEGDT H, VAUQUELIN G, KARLEN A, HALLBERG M. Cyclic insulin-regulated aminopeptidase (IRAP)/AT(4) receptor ligands. *J Pept Sci* 12: 705-13, 2006.
- BARNETT A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 60: 1454-70, 2006.
- BATTERHAM RJ, COWLEY MA, SMALL CJ, HERZOG H, COEHN MA, DAKIN CJ, WREN AM, BRYNES AE, LOW MJ, GHATEI MA, CONE RD, BLOOM SR. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418: 650-654, 2002.
- 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: 2678-87, 2006.
- BEINFELD MC, MEYER DK, BROWNSTEIN MJ. Cholecystokinin octapeptide in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Nature* 288: 376-8, 1980.
- BELHACENE N, MARI B, ROSSI B, AUBERGER. Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation. *Eur J Immunol* 23: 1948-55, 1993.
- BERGMAN AJ, STEVENS C, ZHOU Y, YI B, LAETHEM M, DE SMET M, SNYDER K, HILLIARD D, TANAKA W, ZENG W, TANEN M, WANG AQ, CHEN L, WINCHELL G, DAVIES MJ, RAMAEL S, WAGNER JA, HERMAN GA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. *Clin Ther* 28: 55-72, 2006.
- BERNARDIS LL, PATTERSON BD. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 40: 527-528, 1968.
- BJELKE JR, CHRISTENSEN J, NIELSEN PF, BRANNER S, KANSTRUP AB, WAGTMANN N, RASMUSSEN HB. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* 396: 391-399, 2006.
- BLOCH B, LING N, BENOIT R, WAHRENBORG WB, GUILLEMIN R. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature* 307: 272-273, 1984.
- BOELEN A, WIERSINGA WM, FLIERS E. Fasting-Induced Changes in the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Thyroid*. 18: 123-129, 2008.
- BOGAN JS. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem*. 81:507-32, 2012..
- BRACCI L, FALCIANI C, LELLI B, LOZZI L, RUNCI Y, PINI A, DE MONTIS MG, TAGLIAMONTE A, NERI P. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem* 278: 46590-46595, 2003.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- BRISK KP, BRANDT JA. Oxytocin and vasopressin Neurons in principal and accessory hypothalamic magnocellular structures express fos-immunoreactivity in response to acute glucose deprivation. *J Neuroendocrinol* 12: 409-414, 2000.
- BROOKS P, FUERTES G, MURRAY RZ, BOSE S, KNECHT E, RECHSTEINER MC, HENDIL KB, TANAKA K, DYSON J, RIVETT J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J*. 2000 Feb 15;346 Pt 1:155-61.
- BUNYAN J, MURREL EA, SHAH PP. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. *British J Nutrition* 35: 25-39, 1976.
- Cagampang FR, Maeda K, Yokoyama A, Ota K. Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. *Horm Metab Res* 22: 269-272, 1990.
- CALEGARI VC, TORSONI AS, VANZELA EC, ARAÚJO EP, MORARI J, ZOPPI CC, SBRAGIA L, BOSCHERO AC, VELLOSO LA. Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. *J Biol Chem* 286: 12870-80, 2011.
- CAMIÑA JP, CARREIRA MC, MICIC D, POMBO M, KELESTIMUR F, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF. Regulation of ghrelin secretion and action. *Endocrine* 22: 5-12, 2003.
- CANCELLO R, CLEMENT K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113: 1141-7, 2006.
- CASSIS L, HELTON M, ENGLISH V, BURKE G. Angiotensin II regulates oxygen consumption. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R445-53, 2002.
- CAZETTES F, COHEN JJ, YAU PL, TALBOT H, CONVIT A. Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake. *Brain Res* 1373: 101-9, 2011.
- CHAI SY, FERNANDO R, PECK G, YE SY, MENDELSON FA, JENKINS TA, ALBISTON AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 61: 2728-37, 2004.

- CHANSEL D, CZEKALSKI S, VANDERMEERSCH S, RUFFET E, FOURNIE-ZALUSKI MC, ARDAILLOU R. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 275: F535–F542, 1998.
- CHEN L, LIN YL, PENG G, LI F. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(44):17966–71, 2012.
- CHELIKANI PK, AMBROSE JD, KEISLER DH, KENNELLY JJ. Effect of short-fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 26: 33–48, 2004.
- CILLARI E, ARCOLEO F, DIELI M, D'AGOSTINHO R, GROMO G, LEONI F, MILANO S. The macrophage-activating tetrapeptide tuftsin induces nitric oxide synthesis and stimulates murine macrophages to kill *Leishmania* parasites in vitro. *Infect Immun* 62: 2649–2652, 1994.
- CINTI S. The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech*. 5(5):588–94, 2012.
- CINTI S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 73(1):9–15, 2005.
- CONSTAM DB, TOBLER AR, RENSING-EHL A, KEMLER I, HERSH LB, FONTANA A. Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem* 270: 26931–26939, 1995.
- CUSI K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 10: 306–15, 2010.
- DE SOUZA CT, ARAUJO EP, BORDIN S, ASHIMINE R, ZOLLNER RL, BOSCHERO AC, SAAD MJ, VELLOSO LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 146(10):4192–9, 2005.
- DIMITRIADIS G, MITROU P, LAMBADIARI V, MARATOU E, RAPTIS SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 93 Suppl 1:S52–9, 2011.
- DI GIROLAMO M, MEDLINGER S, FERTIG JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol* 221: 850–58, 1971.
- DYER SH, SAUGHTER CA, ORTH K, MOOMAW CR, HERSH LB. Comparison of the soluble and membrane-bound forms of the puromycin sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases from rat. *J Neurochem* 54: 547–54, 1990.
- DOLNIKOFF M, MARTIN-HIDALGO A, MACHADO UF, LIMA FB, HERRERA E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes and Rel Metab Dis* 25: 426–33, 2001.
- DONG CX, BRUBAKER PL. Ghrelin, the proglucagon-derived peptides and peptide YY in nutrient homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012, in press.
- DONATO J JR, SILVA RJ, SITA LV, LEE S, LEE C, LACCHINI S, BITTENCOURT JC, FRANCI CR, CANTERAS NS, ELIAS CF. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci* 29: 5240–50, 2009.
- DUCLUZEAU PH, FLETCHER LM, VIDAL H, LAVILLE M, TAVARÉ JM. Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Diabetes Metab*. 28(2):85–92, 2002.
- ENGLISH PJ, GHATEI MA, MALIK IA, BLOOM SR, WILDING JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 87(6):2984, 2002.
- FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911–19, 2005.
- FEDERICO A, D'AIUTO E, BORRIELLO F, BARRA G, GRAVINA AG, ROMANO M, DE PALMA R. Fat: a matter of disturbance for the immune system. *World J Gastroenterol*. 16: 4762–72, 2010.
- FERRARIO CM, IYER SN. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept* 78: 13–8, 1998.
- FINE JB, DIGIROLAMO M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. *Int J Obesity* 21: 714–768, 1997.
- FINN PF, DICE JF. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* 22: 830–44, 2006.
- FONSECA-ALANIZ MH, TAKADA J, ALONSO-VALE MIC, LIMA FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50: 216–29, 2006.
- FOULON T, CADEL S, COHEN P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol* 31: 747–50, 1999.
- FRANKISH HM, MCCARTHY HD, DRYDEN S, KILPATRICK A, WILLIAMS G. Neuropeptide Y receptor numbers are reduced in the hypothalamus of streptozotocin-diabetic and food-deprived rats: further evidence of increased activity of hypothalamic NPY-containing pathways. *Peptides* 14: 941–48, 1993.
- FRERKER N, WAGNER L, WOLF R, HEISER U, HOFFMANN T, RAHFELD JU, SCHADE J, KARL T, NAIM HY, ALFALAH M, DEMUTH HU, VON HÖRSTEN S. Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: Structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. *Peptides* 28: 257–268, 2007.
- FUJIKI N, YOSHIDA Y, RIPLEY B, HONDA K, MIGNOT E, NISHINO S. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 12: 993–997, 2001.
- GABRILOVAC J, ABRAMIC M, UZAREVIC B, ANDREIS A, POLJAK L. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) enzyme activity on immature T-cell line R1.1 is down-regulated by dynorphin-A(1-17) as a non-substrate inhibitor. *Life Sci* 73: 151–66, 2003.
- GALIC S, OAKHILL JS, STEINBERG GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 316(2):129–39, 2010.
- GALLWITZ B. GLP-1 agonists and dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Handb Exp Pharmacol* 203: 53–74, 2011.
- GASPARELLO-CLEMENTE E, CASIS L, VARONA A, GIL J, IRAZUSTA J, SILVEIRA PF. Aminopeptidases in visceral organs during alterations in body fluid volume and osmolality. *Peptides* 24: 1367–72, 2003.
- GIL A, OLZA J, GIL-CAMPOS M, GOMEZ-LLORENTE C, AGUILERA CM. Is adipose tissue metabolically different at different sites? *Int J Pediatr Obes*. 6 Suppl 1:13–20, 2011.
- GILMARTIN L, O'CUINN G. Dipeptidyl aminopeptidase IV and aminopeptidase P, two proline specific enzymes from the cytoplasm of guinea-pig brain: their role in metabolism of peptides containing consecutive prolines. *Neurosci Res* 34: 1–11, 1999.
- GIROS B, GROS C, SOLHONE B, SCHWARTZ JC. Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met5)enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and antiaminopeptidase M antibodies. *Mol Pharmacol* 29: 281–287, 1986.
- GHERSI G, CHEN W, LEE EW. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. *Peptides* 22: 453–458, 2001.
- GOLDING BJ, OVERALL AD, BROWN G, GARD PR. Strain differences in the effects of angiotensin IV on mouse cognition. *Eur J Pharmacol* 641: 154–9, 2010.
- GORRELL MD, GYSBERS V, MCCAUGHAN GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 54: 249–264, 2001.
- GRIFFITH EC, SU Z, NIWAYAMA S, RAMSAY CA, CHANG YH, LIU JO. Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(26):15183–8, 1998.
- GROSS DN, FARMER SR, PILCH PF. Glut4 storage vesicles without Glut4: transcriptional regulation of insulin-dependent vesicular traffic. *Mol Cell Biol* 24: 7151–62, 2004.
- HALLBERG M. Targeting the insulin-regulated aminopeptidase/AT4 receptor for cognitive disorders. *Drug News Perspect* 22: 133–9, 2009.
- HATTORI A, TSUJIMOTO M. Processing of Antigenic Peptides by Aminopeptidases. *Biol. Pharm. Bull.* 27(6) 777–780, 2004.
- HERBST JJ, ROSS SA, SCOTT HM, BOBIN SA, MORRIS NJ, LIENHARD GESR. Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes. *Am J Physiol* 272: E600–606, 1997.

- HILDEBRANDT M, REUTTER W, ARCK P, ROSE M, KLAPP BF. A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defense. *Clin Sci* 99: 93-104, 2000.
- HIROYAMA M, FUJIWARA Y, NAKAMURA K, AOYAGI T, MIZUTANI R, SANBE A, TASAKI R, TANOUE A. Altered lipid metabolism in vasopressin V1B receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 602: 455-61, 2009.
- HIRSCHBERG R, KOPPLE JD, BLANTZ RC, TUCKER BJ. Effects of recombinant human insulin-like growth factor I on glomerular dynamics in the rat. *J Clin Invest* 87: 1200-1206, 1991.
- HOEKSTRA A. Prospering on the Fat of the Land: Adipose-derived stem cells as an industrially-viable resource for regenerative treatment. *MMG* 445 Basic Biotechnology 7:24-30, 2011.
- HOTAMISLIGIL GS, MURRAY DL, CHOY LN, SPIEGELMAN BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11):4854-8, 1994.
- HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091):87-91, 1993.
- HOU JC, PESSIN JE. Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 19(4):466-73, 2007.
- HUI KS, GRAF L, LAJTHA A. beta-Endorphin inhibits met-enkephalin breakdown by a brain aminopeptidase: structure-activity relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1482-1487, 1982.
- ILLMAN J, CORRINGHAM R, ROBINSON DJR, DAVIS HM, ROSSI JF, CELLA D, TRIKHA M. Are inflammatory cytokines the common link between cancer-associated cachexia and depression? *Support Oncol* 2005;3: 37-50.
- International Diabetes Federation (IDF) 2005. Disponível em <www.idf.org/home/index.cfm?node=1429> Acesso em 25 ago. 2007.
- INUI, A.; MEGUID, M.M. Cachexia and obesity: two sides of one coin? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6: 395-9.
- IRAZUSTA J, LARRINAGA G, AGIRREGOITIA N, VARONA A, CASIS L. Effect of morphine administration and its withdrawal on rat brain aminopeptidases activities. *Regul Pept* 110: 225-230, 2003.
- ISHIKAWA M, MIZOBUCHI M, TAKAHASHI H, BANDO H, SAITO S. Somatostatin release as measured by in vivo microdialysis: circadian variation and effect of prolonged food deprivation. *Brain Res* 749: 226-231, 1997.
- JAGER J, GREMEAUX T, CORMONT M, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, TANTI JF. Interleukin-1{beta}-Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression. *Endocrinology* 148: 241-51, 2007.
- JERNG HH, KUNJILWAR K, PFAFFINGER PJ. Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J Physiol* 568: 767-88, 2005.
- JERNG HH, QIAN Y, PFAFFINGER PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 87: 2380-96, 2004.
- JOHNSON AR, SKIDGEL RA, GAFFORD JT, ERDOS EG. Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides* 5: 789-96, 1984.
- JONES BH, STANDRIDGE MK, TAYLOR JW, MOUSTAÏD N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol* 273: R236-42, 1997.
- JORDENS I, MOLLE D, XIONG W, KELLER SR, MCGRAW TE. Insulin-regulated aminopeptidase is a key regulator of GLUT4 trafficking by controlling the sorting of GLUT4 from endosomes to specialized insulin-regulated vesicles. *Mol Biol Cell* 21: 2034-44, 2010.
- KADOWAKI M, KANAZAWA T. Amino acids as regulators of proteolysis. *J Nutr* 133 (6 Suppl 1): 2052S-2056S, 2003.
- KAIDANOVICH-BEILIN O, CHA DS, MCINTYRE RS. Crosstalk between metabolic and neuropsychiatric disorders. *F1000 Biol Rep* 4:14, 2012.
- KALRA SP, KALRA PS. NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides* 38(4):201-11, 2004.
- KASPER SO, PHILLIPS EE, CASTLE SM, DALEY BJ, ENDERSON BL, KARLSTAD MD. Blockade of the Renin-Angiotensin system improves insulin receptor signaling and insulin-stimulated skeletal muscle glucose transport in burn injury. *Shock* 35: 80-5, 2011.
- KASTIN AJ, AKERSTROM V, HACKLER L. Food deprivation decreases blood galanin-like peptide and its rapid entry into the brain. *Neuroendocrinology* 74: 423-32, 2001.
- KAUFHOLD A, NIGAM PK, DHIR RN, SHAPIRO BH. Prevention of latently expressed CYP2C11, CYP3A2, and growth hormone defects in neonatally monosodium glutamate-treated male rats by the n-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocilpine maleate. *JPET* 302: 490-96, 2002.
- KAWAI M, OTAKE Y, HARA Y. High-molecular-mass isoform of aminopeptidase N/CD 13 in serum from cholestatic patients. *Clin Chim Acta* 330: 141-49, 2003.
- KELLER SR. Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. *Biol Pharm Bull* 27: 761-4, 2004.
- KELLER SR, DAVIS AC, CLAIRMONT KB. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. *J Biol Chem* 277: 17677-86, 2002.
- KELLER SR, SCOTT HM, MASTICK CC, AEBERSOLD R, LIENHARD GE. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem* 270: 23612-18, 1995.
- KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-56, 2004.
- KLEIN DA, WALSH BT. Eating disorders. *Int Rev Psychiatry* 2003;15: 205-16.
- KRAUS-BERTHIER L, REMOND G, VISALLI M, HENO D, PORTEVIN B, VINCENT M. In vivo immunopharmacological properties of tuftsin and four analogs. *Immunopharmacology* 25: 261-67, 1993.
- KUHL H, SANDOW J, KRAUSS B, TAUBERT HD. Enzyme kinetic studies and inhibition by oligopeptides of LH-RH degradation in rat hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinol* 28: 339-48, 1979.
- LABELLA FS, GEIGER JD, GLAVIN GB. Administered peptides inhibit the degradation of endogenous peptides. The dilemma of distinguishing direct from indirect effects. *Peptides* 6: 645-60, 1985.
- LARSEN SL, PEDERSEN LO, BUUS S, STRYHN A. T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J Exp Med* 184: 183-89, 1996.
- LARRINAGA G, GIL J, MEANA JJ, RUIZ F, CALLADO LF, IRAZUSTA J. Aminopeptidase activity in the postmortem brain of human heroin addicts. *Neurochem Int* 46: 213-19, 2005.
- LEIGH FS, KAUFMAN LN, YOUNG JB. Diminished epinephrine excretion in genetically obese (ob/ob) mice and monosodium glutamate-treated rats. *Int J Obes and Rel Metab Dis* 16: 597-604, 1992.
- LEW RA, MUSTAFA T, YE S, MCDOWALL SG, CHAI SY, ALBISTON AL. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem* 86: 344-50, 2003.
- LIMA FB, THIES RS, GARVEY WT. Glucose and insulin regulate insulin sensitivity in primary cultured adipocytes without affecting insulin receptor kinase activity. *Endocrinology* 128: 2415-26, 1991.
- LIJNEN HR, FRÉDERIX L, VAN HOEF B. Fumagillin reduces adipose tissue formation in murine models of nutritionally induced obesity. *Obesity* 18: 2241-6, 2010.
- LOHN M, MUELLER C, LANGNER J. Cell cycle retardation in monocytoid cells induced by aminopeptidase N (CD13). *Leuk Lymphoma* 43: 407-13, 2002.

- LOH YP, BIRCH NP, CASTRO MG. Pro-opiomelanocortin and pro-vasopressin converting enzyme in pituitary secretory vesicles. *Biochimie* 70: 11-6, 1988.
- LONE AM, NOLTE WM, TINOCO AD, SAGHATELIAN A. Peptidomics of the prolyl peptidases. *AAPS Journal* 12: 483-91, 2010.
- LOPEZ M, SEOANE L, GARCIA MC, LAGO F, CASANUEVA FF, SENARIS R, DIEGUEZ C. Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 41-5, 2000.
- LOOK AT, ASHMUN RA, SHAPIRO LH, PEIPER SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest* 83: 1299-307, 1989.
- MACHO L, FICKOVA M, ZORAD S, SEBOKOVA E, KLIMES I. Effects of new hypoglycemic agent A-4166 on lipolysis and lipogenesis in rat adipocytes. *Endocr Regul* 34: 119-26, 2000.
- MAE T, KONISHI E, HOSOE K, HIDAKA T. Isolation and identification of major metabolites of rifalazil in mouse and human. *Xenobiotica* 29: 1073-87, 1999.
- MAES MB, SCHARPÉ S, DE MEESTER I. Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clin Chim Acta* 380: 31-49, 2007.
- MAES M, MONTELEONE P, BENCIVENGA R, GOOSSENS F, MAJ M, VAN WEST D, BOSMANS E, SCHARPE S. Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 26: 17-26, 2001.
- MAHONEY KMM, PETROVIC N, SCHACKE W, SHAPIRO LH. CD13/APN transcription is regulated by the proto-oncogene c-Maf via an atypical response element. *Gene* 403: 178-87, 2007.
- MAIANU L, KELLER SR, GARVEY WT. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5450-6, 2001.
- MANTOVANI A, GRAY PA, VAN DAMME J, SOZZANI S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leuk Biol* 68: 400-404, 2000.
- MARI A, SALLAS WM, HE YL, WATSON C, LIGUEROS-SAYLAN M, DUNNING BE, DEACON CF, HOLST JJ, FOLEY JE. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model-assessed beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4888-94, 2005.
- MARTIN AD, DRINKWATER DT. Variability in the measures of body fat. *Sports Medicine* 11(5): 277-288, 1991.
- MARTÍNEZ-MARTOS JM, CARRERA-GONZÁLEZ MD, DUEÑAS B, MAYAS MD, GARCÍA MJ, RAMÍREZ-EXPÓSITO MJ. Renin angiotensin system-regulating aminopeptidase activities in serum of pre- and postmenopausal women with breast cancer. *Breast* 20(5):444-7, 2011.
- MATSUMOTO H, MORI T. Changes in cystine aminopeptidase (oxytocinase) activity in mouse serum, placenta, uterus and liver during pregnancy or after steroid hormone treatments. *Zool Sci* 15: 111-115, 1998.
- MATSUYAMA S, OHKURA S, IWATA K, UENOYAMA Y, TSUKAMURA H, MAEDA K, KIMURA K. Food deprivation induces monocarboxylate transporter 2 expression in the brainstem of female rat. *J Reprod Dev* 55: 256-61, 2009.
- MAURIZ JL, MARTÍN-RENEO J, GARCÍA-PALOMO A, TUÑÓN MJ, GONZÁLEZ-GALLEGO J. Methionine aminopeptidases as potential targets for treatment of gastrointestinal cancers and other tumours. *Curr Drug Targets*. 11(11):1439-57, 2010.
- MCDERMOTT JR, MANTLE D, LAUFFART B, KIDD AM. Purification and characterization of a neuropeptide-degrading aminopeptidase from human brain. *J. Neurochem* 45: 752-59, 1985.
- MCKEEL DW, JARETT L. Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells. *The Journal of Cell Biology* 44: 417-32, 1970.
- MCNURLAN MA. New perspectives in the control of body protein metabolism. *Br J Nutr*. 108 Suppl 2:S94-104, 2012.
- MEDEIROS MD, TURNER AJ. Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. *Endocrinology* 134: 2088-94, 1994.
- MENDES MT, MURARI-DO-NASCIMENTO S, TORRIGO IR, ALPONTI RF, YAMASAKI SC, SILVEIRA PF. Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis. *Regul Pept* 167: 215-21, 2011.
- MENTLEIN R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 85: 9-24, 1999.
- MENTLEIN R. Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett* 234: 251-56, 1988.
- MINER JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J Anim Sci*:82(3):935-41, 2004.
- MIZUTANI S, GOTO K, NOMURA S, INO K, GOTO S, KIKKAWA F, KURAUCHI O, GOLDSTEIN G, TOMODA Y. Possible action of human placental aminopeptidase N in feto-placental unit. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 82: 65-80, 1993.
- MIZUTANI S, SAFWAT MA, GOTO K, TSUJIMOTO M, NAKAZATO H, ITAKUR A, MIZUNO M, KURAUCHI O, KIKKAWA F, TOMODA Y. Initiating and responsible enzyme of arginine vasopressin degradation in human placenta and pregnancy serum. *Regul Pept* 59: 371-78, 1995.
- MÜNZBERG H, BJÖRNHOLM M, BATES SH, MYERS MG JR. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci*. 62(6):642-52, 2005..
- NADAL MS, OZAITA A, AMARILLO Y, DE MIERA EV-S, MA Y, MO W, GOLDBERG EM, MISUMI Y, IKEHARA Y, NEUBERT TA, RUDY B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 37: 449-61, 2003.
- NAGASAKA T, NOMURA S, OKAMURA M, TSUJIMOTO M, NAKAZATO H, OISO Y, NAKASHIMA N, MIZUTANI S. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. *Reprod Fertility Develop* 9: 747-53, 1997.
- NAKAGAWA T, UKAI K, OHYAMA T, GOMITA Y, OKAMURA H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. *Exp Anim* 49: 239-49, 2000.
- NAKAMURA H, ITAKUARA A, OKAMURA M, ITO M, IWASE A, NAKANISHI Y, OKADA M, NAGASAKA T, MIZUTANI S. Oxytocin stimulates the translocation of oxytocinase of human vascular endothelial cells via activation of oxytocin receptors. *Endocrinology* 141: 4481-85, 2000.
- NARAYANAN SS, RAMANUJAN A, KRISHNA S, NAMPOOTHIRI KM. Purification and biochemical characterization of methionine aminopeptidase (MetAP) from *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Appl Biochem Biotechnol* 151: 512-21, 2008.
- NARDELLI TR, RIBEIRO RA, BALBO SL, VANZELA EC, CARNEIRO EM, BOSCHERO AC, BONFLEUR ML. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino Acids* 41(4): 901-8, 2011.
- NEMEROFF CB, LIPTON MA, KIZER JS. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Dev Neurosci* 1: 102-9, 1978.
- NIKOLAOU A, EYNDE IV, TOURWÉ D, VAUQUELIN G, TÓTH G, MALLAREDDY JR, POGLITSCH M, VAN GINDERACHTER JA, VANDERHEYDEN PM. [(3)H]IVDE77, a novel radioligand with high affinity and selectivity for the insulin-regulated aminopeptidase. *Eur J Pharmacol*. 2013, in press.
- O'CUINN G. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem Soc Trans* 26: 279-91, 1998.
- OLCHOVSKY D, SONG J, GELATO MC, SHERWOOD J, SPATOLA E, BRUNO JF, BERELOWITZ M. Pituitary and hypothalamic insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor expression in food-deprived rats. *Mol Cell Endocrinol* 93: 193-8, 1993.

- OLIVO RA, TEIXEIRA CF, SILVEIRA PF. Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resident and elicited cells. *Biochem Pharmacol* 69: 1441-50, 2005.
- OLSEN C, WAGTMANN N. Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. *Gene* 299: 185-193, 2002.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). 2006a. Fact sheet nº311. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em 23 abril 2012.
- ORNING L, GIERSE JK, FITZPATRICK FA. The bifunctional enzyme leukotriene-A4 hydrolase is an arginine aminopeptidase of high efficiency and specificity. *J Biol Chem* 269: 11269-73, 1994.
- PALTER SF., MULAYIM N, SENTURK L, ARICI A. Interleukin-8 in the human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2660-2667, 2001.
- PEREIRA-LANCHA LO, CAMPOS-FERRAZ PL, LANCHA AH JR. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 5:75-87, 2012.
- PERELLO M, MORENO G, GAILLARD RC, SPINEDI E. Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol Lett* 25: 119-126, 2004.
- PETHIYAGODA CL, WELCH DR, FLEMING TP. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 18: 391-400, 2000.
- PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 45, 2001.
- PILAR CARRERA M, RAMÍREZ-EXPÓSITO MJ, DUEÑAS B, DOLORES MAYAS M, JESÚS GARCÍA M, DE LA CHICA S, CORTÉS P, RUÍZ-SANJUAN M, MARTÍNEZ-MARTOS JM. Insulin-regulated aminopeptidase/placental leucil Aminopeptidase (IRAP/P-IAP) and angiotensin IV-forming activities are modified in serum of rats with breast cancer induced by N-methyl-nitrosourea. *Anticancer Res* 26: 1011-4, 2006.
- PITOCCHO D, ZACCARDI F, MARTINI F, SCAVONE G, MUSELLA T, CAPUTO S, GHIRLANDA G. Severe leucopenia associated with Sitagliptin use. *Diabetes Res Clin Pract*. 91: e30-2, 2011.
- PRESSE F, SOROKOVSKY I, MAX JP, NICOLAIDIS S, NAHON JL. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. *Neuroscience* 71: 735-45, 1996.
- PRIETO I, HERMOSO F, GASPARO M, VARGAS F, ALBA F, SEGARRA AB, BANEGAS I, RAMIREZ M. Angiotensinase activities in the kidney of renovascular hypertensive rats. *Peptides* 24: 755-60, 2003.
- QI SY, RIVIERE PJ, TROJNAR J, JUNIEN JL, AKINSANYA KO. Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 373: 179-189, 2003.
- QUEIROZ JC, ALONSO-VALE MI, CURRI R, LIMA FB. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(5):582-94, 2009.
- RAHFELD J, SCHIERBORN M, HARTRODT B, NEUBERT K, HEINS J. Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1076: 314-16, 1991.
- RAMIREZ M, ARECHAGA G, GARCIA S, SANCHEZ B, LARDELLI P, GANDARIAS JM. Mn2(+)-activated aspartate aminopeptidase activity, subcellular localization in young and adult rat brain. *Brain Res* 522: 165-67, 1990.
- RODBELL M. Metabolism of isolated fat cells. *J Biol Chem* 239: 375-80, 1964.
- ROGI T, TSUJIMOTO M, NAKAZATO H, MIZUTANI S, TOMODA Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *Biol Chem* 271: 56-61, 1996.
- RONAI AZ, TIMAR J, MAKÓ E, ERDO F, GYARMATI Z, TOTTH G, OROSZ G, FURST S, SZEKELY JI. Diprotin A, an inhibitor of dipeptidyl aminopeptidase IV (EC 3.4.14.5) produces naloxone-reversible analgesia in rats. *Life Sci* 64: 145-52, 1999.
- ROSENBLUM JS, KOZARICH JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Bio*. 7: 496-504, 2003.
- RÜSTER C, WOLF G. The role of the Renin-Angiotensin-aldosterone system in obesity-related renal diseases. *Semin Nephrol*. 33(1):44-53, 2013.
- SAFAVI A, HERSH LB. Degradation of dynorphin-related peptides by the puromycin-sensitive aminopeptidase and aminopeptidase M. *J Neurochem* 65: 389-95, 1995.
- SAKURADA C. Development of a new analgesic based on metabolism of endomorphin, an endogenous opioid peptide. *Yakugaku Zasshi* 124: 549-54, 2004.
- SAKURADA C, SAKURADA S, HAYASHI T, KATSUYAMA S, TAN-NO K, SAKURADA T. Degradation of endomorphin-2 at the supraspinal level in mice is initiated by dipeptidyl peptidase IV: an in vitro and in vivo study. *Biochem Pharm* 66: 653-61, 2003.
- SALERS P. Enhancement by streptozotocin-induced diabetes of pancreatic prolyl endopeptidase activity in neonatal rats. *Regul Pept* 50: 101-11, 1994.
- SANCHO V, TRIGO MV, GONZÁLEZ N, VALVERDE I, MALAISSE WJ, VILLANUEVA-PENACARRILLO ML. Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 35, 27-38, 2005.
- SANÍGER MA, RAMÍREZ-EXPÓSITO MJ, DE LA CHICA S, CARRERA-GONZÁLEZ MP, MAYAS MD, MANUEL MARTÍNEZ-MARTOS J. Alpha-1-adrenergic receptor blockade modifies insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) activity in rat prostate and modulates oxytocin functions. *Drug Metab Lett*. 5(3):192-6, 2011.
- SARIC T, BENINGA J, GRAEF CI, AKOPIAN TN, ROCK KL, GOLDBERG AL. Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J Biol Chem* 276(39):36474-81, 2001.
- SANDERINK GJ, ARTUR Y, SIEST G. Human aminopeptidases: a review of the literature. *J Clin Chem Clin Biochem* 26: 795-807, 1988.
- SCALLET AC, OLNEY JW. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. *Brain Res* 374: 380-84, 1986.
- SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-79, 1987.
- SCHEEN AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab* 30: 498-505, 2004.
- SCHENK S, SABERI M, OLEFSKY JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 118(9):2992-3002, 2008.
- SCHWARTZ MW, SIPOLS AJ, GRUBIN CE, BASKIN DG. Differential effect of fasting on hypothalamic expression of genes encoding neuropeptide Y, galanin, and glutamic acid decarboxylase. *Brain Res Bull* 31: 361-367, 1993.
- SCOMPARIN DX, GRASSIOLLI S, GOMES RM, TORREZAN R, DE OLIVEIRA JC, GRAVENA C, PÊRA CC, MATHIAS PC. Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. *Endocr Res*. 36: 83-90, 2011.
- SERRADEIL-LE GAL C, LAFONTAN M, RAUFASTE D, MARCHAND J, POUZET B, CASELLAS P, PASCAL M, MAFFRAND JP, LE FUR G. Characterization of NPY receptors controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes. *FEBS Lett* 475: 150-6, 2000.
- SHAPIRO BN, ALBUCHER RC, MACLEOD JN, BITAR MS. Normal levels of hepatic drug-metabolizing enzymes in neonatally induced growth hormone-deficient adult male and female rats. *Drug Metab Dispos* 14: 585-89, 1986.
- SHIPP MA, LOOK AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 82: 1052-1070, 1993.
- SIMPSON IA, YVER DR, HISSIN PJ, WARDZALA LJ, KARNIELI E, SALANS LB, CUSHMAN SW. Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: Characterization of subcellular fractions. *Biochimica et Biophysica Acta* 763: 393-407, 1983.
- SMYTH M, O'CUINN G. Dipeptidyl aminopeptidase activities of guinea-pig brain. *Int J Biochem* 7: 913-21, 1994.

- SONG B, MARVIZON JC. Peptidases prevent mu-opioid receptor internalization in dorsal horn neurons by endogenously released opioids. *J Neurosci* 23: 1847-1858, 2003.
- SONG LJ, HEALY DP. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertension* 33: 746-752, 1999.
- SPIEGELMAN BM, FLIER JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-43, 2001.
- SOOS S, BALASKO M, JECH-MIHALFFY A, SZEKELY M, PETERVARI E. Anorexic vs. metabolic effects of central leptin infusion in rats of various ages and nutritional states. *J Mol Neurosci*. 41(1):97-104, 2010.
- STRAGIER B, DEMAEGDT H, DE BUNDEL D, SMOLDERS I, SARRE S, VAUQUELIN G, EBINGER G, MICHOTTE Y, VANDERHEYDEN P. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase and/or aminopeptidase N in the angiotensin IV-induced effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Brain Res* 1131: 97-105, 2007.
- SUZUKI N, OKADA K, SUGIHARA H, MINAMI S, WAKABAYASHI I. Caloric intake stimulates growth hormone secretion in food-deprived rats with anterolateral deafferentation of the medial basal hypothalamus or administered antiserum to somatostatin. *J Neuroendocrinol* 7: 483-90, 1995.
- SWARTZ TD, SAVASTANO DM, COVASA M. Reduced sensitivity to cholecystokinin in male rats fed a high-fat diet is reversible. *J Nutr*. 140(9):1698-703, 2010.
- TESAURO M, CARDILLO C. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011, in press.
- THAIS F, WOLF G, ASSAD N, ZAHNER G, STAHL RA. Angiotensinase A gene expression and enzyme activity in isolated glomeruli of diabetic rats. *Diabetologia* 39: 275-80, 1996.
- THUNNISSEN MM, NORDLUND P, HAEGGSTROM JZ. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat Struct Biol* 8: 131-5, 2001.
- TRIPLITT C, CHIQUETTE E. Exenatide: from the Glia monster to the pharmacy. *J Am Pharm Assoc* 46: 44-52; quiz 53-5, 2006.
- UNGER EK, PIPER ML, OLOFSSON LE, XU AW. Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. *Endocrinology*. 151(2):671-82, 2010.
- VAN DE SANDE-LEE S, VELLOSO LA. [Hypothalamic dysfunction in obesity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 56(6):341-50, 2012.
- VARONA A, SILVEIRA PF, IRAZUSTA A, VALDIVIA A, GIL J. Effects of changes in hydromineral balance on rat brain aspartyl, arginyl, and alanyl aminopeptidase activities. *Horm Metab Res*. 35(1):36-42, 2003.
- VERSPÖHL EJ, ZOLL C, WAHL MA, AMMON HP. The role of cholecystokinin (CCK8) on glucose production and elimination, and on plasma insulin and glucose in rats. *Peptides* 13: 1091-5, 1992.
- VIJOVIC P, LAKIC I, LAKETA D, JASNIC N, DJURASEVIC SF, CVIJIC G, DJORDJEVIC J. Time-dependent effects of starvation on serum, pituitary and hypothalamic leptin levels in rats. *Physiol Res*. 60 Suppl 1:S165-70, 2011.
- WALLIS MG, LANKFORD MF, KELLER SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1092-102, 2007.
- WALTER R, SHLANK H, GLASS JD, SCHWARTZ IL, KERENYI TD. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science* 173: 827-29, 1971.
- WANG J, LIN Q, WU Q, COOPER MD. The enigmatic role of glutamyl aminopeptidase (BP-1/6C3 antigen) in immune system development. *Immunol Rev* 161: 71-77, 1998.
- WANG J, WALKER H, LIN Q, JENKINS N, COPELAND NG, WATANABE T, BURROWS PD, COOPER MD. *Genomics* 33: 167-176, 1996.
- WATSON RT, PESSIN JE. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res*. 271(1):75-83, 2001.
- WCISLO, G.; KORNILUK, J.; WOJTUN, S. The role of proteasome in pathophysiology of cancer cachexia. *Pol Merkuriusz Lek* 17 (Suppl 1): 47-9, 2004.
- WEBER JM, REIDY SP. Extending food deprivation reverses the short-term lipolytic response to fasting: role of the triacylglycerol/fatty acid cycle. *J Exp Biol*. 215(Pt 9):1484-90, 2012.
- WEILAND F, VERSPOHL EJ. Local formation of angiotensin peptides with paracrine activity by adipocytes. *J Pept Sci* 15: 767-76, 2009.
- WELCH PA. Regulation of B cell precursor proliferation by aminopeptidase A. *Int Immunol* 7: 737-46, 1995.
- WONG RH, SUL HS. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 10: 684-91, 2010.
- WRIGHT JW, HARDING JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT-1, AT-2, and AT-4 and their functions. *Regul Pept* 59: 269-95, 1995.
- Wright JW, Harding JW. Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Rev* 25: 96-124, 1997.
- WYNNE K, STANLEY S, MCGOWAN B, BLOOM S. Appetite control. *J Endoc* 184: 291-318, 2005.
- YANG K. *Adipose tissue protocols*. 2 ed., Human Press, 2008.
- YAO TW, KIM WS, YU DM, SHARBEEN G, MCCAUGHAN GW, CHOI KY, XIA P, GORRELL MD. A Novel Role of Dipeptidyl Peptidase 9 in Epidermal Growth Factor Signaling. *Mol Cancer Res*. In press
- YASOTHRSRIKUL S, TONEFF F, HWANG SR, HOOK VY. Arginine and lysine aminopeptidase activities in chromaffin granules of bovine adrenal medulla: relevance to prohormone processing. *J Neurochem* 70: 153-63, 1998.
- YEH JRJ, MOHAN R, CREWS CM. The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21 CIPyWAF for endothelial cell growth arrest. *PNAS* 97(23): 12782-12787, 2000.
- YVAN-CHARVET L, QUIGNARD-BOULANGÉ A. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney Int* 79: 162-8, 2011.
- ZAMBOTTI-VILLELA L, YAMASAKI SC, VILLARROEL JS, ALPONTI RF, SILVEIRA PF. Prospective evaluation of aminopeptidase activities in plasma and peripheral organs of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest* 31: 492-8, 2008.
- ZAMBOTTI-VILLELA L, YAMASAKI SC, VILLARROEL JS, ALPONTI RF, SILVEIRA PF. Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 1170: 112-8, 2007a.
- ZAMBOTTI-VILLELA L, YAMASAKI SC, VILLARROEL JS, MURENA-NUNES C, SILVEIRA PF. Prolyl, cystyl and pyroglutamyl peptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Peptides* 28: 1586-95, 2007b.
- ZAMMARETTI F, PANZICA G, EVA C. Fasting, leptin treatment, and glucose administration differentially regulate Y(1) receptor gene expression in the hypothalamus of transgenic mice. *Endocrinology* 142: 3774-82, 2001.
- ZENGIN A, NGUYEN AD, WONG IP, ZHANG L, ENRIQUEZ RF, EISMAN JA, HERZOG H, BALDOCK PA, SAINSBURY A. Neuropeptide Y mediates the short-term hypometabolic effect of estrogen deficiency in mice. *Int J Obes (Lond)*. 1-9, 2012
- ZEYDA M, STULNIG TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 55(4):379-86, 2009
- ZHANG W, DELLA-FERA MA, HARTZELL DL, HAUSMAN D, BAILE CA. Adipose tissue gene expression profiles in ob/ob mice treated with leptin. *Life Sci*. 83(1-2):35-42, 2008.
- ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, JM. *Nature* 1994;372: 425-32.
- ZIABER J, BAJ Z, PASNIK J, CHMIELEWSKI H, TCHÓRZEWSKI H. Expression of aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cells' surface as a marker of these cells' transendothelial migration properties in the course of multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation* 9: 45-48, 2000.
- ZIGMAN, J.M.; ELMQUIST, J.K. *Endocrinology* 2003;144: 3749-56.

ZINI S, FOURNIE-ZALUSKI MC, ROQUES BP, CORVOL P, LLORENS-CORTES C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11968-11973, 1996.