Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti

Caracterização Fenotípica de Camundongos *Knockout* para Neurolisina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti

Caracterização Fenotípica de Camundongos *Knockout* para Neurolisina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cavalcanti, Diogo Manuel Lopes de Paiva.
Caracterização fenotípica de camundongos Knockout para neurolisina / Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Metabolismo de peptídeos.

Versão do título para o inglês: Phenotype characterization of neurolysin Knockout mice.

1. Neurolisina 2. Peptídeos 3. Insulina 4. Metabolismo de glicose 5. Gliconeogênese 6. Peptídeos intracelulares I. Ferro, Emer Suavinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB014/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti.

Título da Tese: Caracterização fenotípica de camundongos Knockout para neurolisina.

Orientador(a): Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **44** nas fls. **86** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Emer Suavinho Ferro, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização fenotípica de camundongos Knockout para a EP24.16 (EC 3.4.24.16; Neurolisina)** do qual participou(aram) o(s) **Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti e o pesquisador Leandro Mantovani de Castro,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **20.04.2010,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 20 de abril de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Deus, que esteve presente em todos os momentos, sempre me guiando para as melhores escolhas.

Aos meus pais Gonçalo e Fátima e meu irmão Rodolfo, pelo apoio, incentivo, confiança e amor durante toda a minha a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro, pela oportunidade, confiança e orientação durante todo o dourorado.

Ao Prof. Dr. Michael Bader, pela oportunidade, hospitalidade, suporte e supervisão durante a minha estadia na Alemanha.

Ao Prof. Dr. Carlos Barros e a Dra. Ines Schadock, pela amizade, incentivo e ajuda durante vários dos experimentos realizados.

As minhas tias Socorro Medeiros e Luzia Cecília e a todos os meus familiares, pelo apoio, incentivo e confiança que depositaram em mim durante todos os anos da minha formação.

Aos meus amigos de laboratório, Christiane Araújo, Denise Berti, Elisabete Silva, Kelly Saito, Leandro Castro, Lílian Russo, Lílian Cruz, Natália Ribeiro e Priscila Sayami pela amizade, pelos momentos de descontração e pela troca de conhecimento.

Aos membros do Laboratório do Prof. Dr. Michael Bader, pela hospitalidade e ajuda em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos, Celma, Clovis Cellotto, Marcio Rosa, Marcelino, Luciano e Zuma, pela amizade, conselhos, viagens, companheirismo e por todos os momentos que estiveram juntos comigo.

Aos meus amigos da Alemanha, Ashish, Andréia, Charlotte, Danielle, Günta, Harald, Luisa e Valéria pela amizade, troca cultural e pelos vários momentos incríveis que vivemos.

Aos meus amigos de São Paulo, Alex Shimura, André Beghini, Cleber Filgueiras, Danilo Batista, Eduardo Dimas, Fábia Cordeiro, Fábio Feitoza, Ingrid Filgueiras, Izaias Leal, Magnun Filgueiras e Wilton Darleans, pela amizade, conversas, risadas e todos os momentos de descontração.

Aos professores, funcionários, secretárias, bibliotecárias, técnicos e bioteristas, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e à Pró-reitoria de pesquisa da USP (projeto NAPPS) pelo apoio financeiro, indispensável para realização desse trabalho.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para o meu desenvolvimento intelectual durante esses 4 anos de doutorado.

Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado. Era uma tarde nublada e fria e as crianças brincavam despreocupadas. De repente, o gelo se quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou. A outra, vendo seu amiguinho preso e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim quebrá-lo e libertar o amigo. Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:

- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão pequeno e com mãos tão frágeis!

Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:

- Eu sei como ele conseguiu.

Todos perguntaram:

- Pode nos dizer como?

- É simples – respondeu o velho.

- Não havia ninguém ao seu redor, para lhe dizer que não seria capaz.

Albert Einstein

RESUMO

CAVALCANTI, D. M. L. P. **Caracterização fenotípica de camundongos *knockout* para neurolisina**. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A oligopeptidase neurolina (E.C.3.4.24.16; Nln) foi identificada pela primeira vez em membranas sinápticas de cérebro de ratos, participando no metabolismo de peptídeos bioativos como neurotensina e bradicinina. Foi sugerido que a redução na atividade enzimática da Nln, em tecido adiposo de comundongos superexpressando a enzima conversora de angiotensina, pode melhorar a sensibilidade à insulina. Nesse trabalho, nós mostramos que camundongos *knockout* para Nln (KO) são mais tolerantes à glicose, mais sensíveis à insulina e apresentam maior gliconeogênese. Os animais KO apresentaram um aumento na expressão de mRNAs para vários genes relacionados com a gliconeogênese no fígado, e a contração do músculo esquelético no gastrocnêmio. A semiquantificação de peptídeos revelou um aumento de peptídeos intracelulares específicos tanto no músculo gastrocnêmio como no tecido adiposo epididimal, que são tecidos chave para a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. Esses resultados sugerem, pela primeira vez, que a Nln participe no metabolismo energético, e pode ser um novo alvo terapêutico para melhorar a captação de glicose e a sensibilidade à insulina.

Palavras-chave: Neurolisina. Peptídeos. Insulina. Metabolismo de glicose. Gliconeogênese. Peptídeos intracelulares.

ABSTRACT

CAVALCANTI, D. M. L. P. **Phenotype characterization of neurolysin knockout mice**. 2014. 92 p. Ph. D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The oligopeptidase neurolysin (EC 3.4.24.16; Nln) was first identified in rat brain synaptic membranes and shown to ubiquitously participate in the catabolism of bioactive peptides such as neurotensin and bradykinin. Recently, it was suggested that Nln reduction could improve insulin sensitivity. Here, we have shown that Nln knockout mice (KO) have increased glucose tolerance, insulin sensitivity and gluconeogenesis. KO mice have increased liver mRNA for several genes related to gluconeogenesis. Isotopic label semi-quantitative peptidomic analysis suggests increase in specific intracellular peptides in gastrocnemius and epididymal adipose tissue, which likely is involved with the increased glucose tolerance and insulin sensitivity in the KO mice. These results suggest the exciting new possibility that Nln is a key enzyme for energy metabolism and could be a novel therapeutic target to improve glucose uptake and insulin sensitivity.

Keywords: Neurolysin. Peptides. Insulin. Glucose metabolism. Gluconeogenesis. Intracellular peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Visão geral da estrutura cristalográfica da Nln 21
Figura 2 – Esquema representativo das vias gliconeogênicas no fígado 29
Figura 3 – Representação da estrutura do gene da Nln e da localização do vetor *Gene Trap* (pGT1dTMpfs) 34
Figura 4 – Esquema tradicional de *backcross* para limpeza do *background* genético e geração de camundongo congênito, iniciando com comundongos *knockout* (129ola/Nln$^{-/-}$, contendo o inserto *Gene trap*) e um C57BL/6 35
Figura 5 – Marcadores TMAB utilizados para marcação isotópica 46
Figura 6 – Esquema da representação da marcação isotópica dos peptídeos obtidos dos animais WT quando comparados com os animais KO 47
Figura 7 – Padrão de bandas após a genotipagem para identificação do inserto *Gene Trap* dos camundongos *knockout* para Nln 50
Figura 8 – Ensaios de qPCR, *Western blotting* e atividade enzimática para confirmação dos animais *knockout* para Nln 51
Figura 9 – Análise densitométrica da composição corporal e da massa corporal 52
Figura 10 – Teste de tolerância à glicose (GTT) 53
Figura 11 – Teste de tolerância à insulina (ITT).....53
Figura 12 – Teste de tolerância à piruvato (Gliconeogênese) 54
Figura 13 – qPCR para expressão de genes envolvidos na gliconeogênese 55
Figura 14 – *Western blotting* para fosforilação de AKT 56
Figura 15 – Ensaio de atividade enzimática da Nln em diferentes tecidos 57
Figura 16 – Teste de corrida alta e baixa resistência física 59
Figura 17 – Análise da composição de fibras musculares no músculo estriado esquelético 60
Figura 18 – Atividade mitocondrial do músculo gastrocnêmio 61
Figura 19 – Análise histológica de diferentes tecidos corados com H&E 62
Figura 20 – Pressão arterial e frequência cardíaca 63
Figura 21 – Pressão arterial após administração aguda de diferentes neuropeptídios 64
Figura 22 – Representação dos espectros de MS dos peptídeos marcados com D0-,

D3- e D9-TMAB 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso relativo de diferentes órgãos.....52
Tabela 2 – Resumo do perfil global de peptídeos intracelulares quantificados por LC-ESI MS.....67
Tabela 3 – Quantificação dos peptídeos intracelulares sequenciados nos diferentes tecidos analisados.....68
Tabela 4 – Percentual de hidrólise relativa dos peptídeos identificados como possíveis substratos da Nln.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – serina/treonina proteína quinase AKT

Arg – arginina

AT1 – receptores de angiotensina 1

BCA – ácido bicinconínico

BPM – batimentos por minuto

CaM – calmodulina

cAMP – AMP cíclico

cDNA – DNA complementar

CHO-S – células de ovário de hamster

COX – citocromo oxidase

Cox4i1 – citocromo c oxidase subunidade 4, isoforma 1

Cpe – Carboxipeptidase E

Creb1 – proteína ligante ao elemento responsivo de AMP cíclico

CRTC2/TORC2 – regulador transcricional coativador de Creb1 2

CS – citrato sintase

DAB – 3,3' diaminobenzidina

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPP-4 – dipeptidil peptidase 4

ECA – enzima conversora de angiotensina (EC 3.4.15.1)

EOPA – endooligopeptidase A (EC 3.4.22.19)

EP24.15 – thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15)

EP24.16 – Nln (EC 3.4.24.16)

ESI – *eletron spray ionization*

Fbp1 – frutose 6-bisfosfatase

FBPase – frutose 6-bisfosfatase

FoxO1 – forkhead box O1

FoxO3 – forkhead box O3

FoxO4 – forkhead box O4

G6Pase – glicose-6-fosfatase

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Gck – glicoquinase

Glu – glutamina

GLUT4 – proteína transportadora de glicose 4

GPCR – receptores acoplados a proteinas G

GTT – teste de tolerância à glicose

H&E – coloração histológica com hematoxilina e eosina

HCl – ácido clorídrico

HET – heterozigoto

HR – frequência cardíaca

IGTC – Consórcio Internacional *Gene Trap*

IRS – substratos do receptor de insulina

ITT – teste de tolerância à insulina

K_{ITT} – constante de decaimento da glicose

KO – camundongos knockout para Neurolisina

LC – cromatografia líquida

MAP – pressão arterial

Myh1 – polipeptídeo 1 da cadeia pesada da miosina do músculo esquelético adulto

Myh2 – polipeptídeo 2 da cadeia pesada da miosina do músculo esquelético adulto

Myh4 – polipeptídeo 4 da cadeia pesada da miosina do músculo esquelético

Myh7 – cadeia pesada da miosina, isoforma beta do músculo cardíaco

Nln – neurolisina

OCT – *optimal cutting temperature*

pb – pares de bases

PC – piruvato carboxilase

Pck – fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinase

PEP – fosfoenolpiruvato

PEPCK-C – fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinase

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

PKA – proteína quinase A

POP – prolil peptidase (EC 3.4.21.26)

PPARα – receptor ativado pelo proliferador do peroxissomo alfa

PPARγ – receptor ativado pelo proliferador do peroxissomo gama

Pro – prolina

Pvalb – parvalbumina

qPCR – real-time PCR

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SDH – succinato desidrogenase

SPR – ressonância plasmônica de superfície

TFA – ácido trifluoracético

Thr – treonina

TMAB – Trimetilamôniobutiril

Tnnc1 – troponina cardíaca c

Tnni1 – troponina i1

Tnni2 – troponina i2

Tnnt1 – troponina t

TOP – thimet oligopeptidase

Tyr – tirosina

UAF – unidades arbitrárias de fluorescência

WT – camundongo selvagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 Objetivos 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 Classificação das peptidases 20

2.2 Neurolisina 21

2.3 Metabolismo e funções biológicas de peptídeos intracelulares 22

2.4 Metabolismo energético 25

2.5 Gliconeogênese 27

2.6 Músculo esquelético e plasticidade muscular 31

3 MATERIAIS E MÉTODOS 34

3.1 Geração e caracterização de camundongos *knockout* para Nln 34

3.2 Microssatélites 36

3.3 Extração de DNA e genotipagem 37

3.4 Peso e composição corpórea 37

3.5 Teste de tolerância a glicose, insulina e piruvato 37

3.6 Extração de proteínas 38

3.7 Atividade enzimática 38

3.8 *Western blotting* 39

3.9 *Real-time* PCR 40

3.10 Teste de esforço progressivo em esteira 41

3.11 Análises histológicas 41

3.12 Atividade mitocondrial 42

3.13 Pressão arterial 43

3.14 Extração de peptídeos 43

3.15 Quantificação de peptídeos 44

3.16 Marcação isotópica de peptídeos 45

3.17 Análises por LC-MS/MS 46

3.18 Ensaio de hidrólise dos peptídeos identificados como possíveis substratos da Nln 49

3.19 Análises estatísticas 49

4 RESULTADOS 50

4.1 Geração de camundongos *knockout* para Nln 50

4.2 Características básicas de camundongos *knockout* para Nln 51

4.3 Testes de tolerância à glicose, insulina e piruvato 52

4.4 Sinalização da glicose – *Western blotting* 55

4.5 Testes de atividade enzimática da Nln em diferentes tecidos 57

4.6 Testes de esforço progressivo em esteira 57

4.7 Composição de fibras musculares analisadas por qPCR 59

4.8 Atividade mitocondrial 61

4.9 Análises histológicas 62

4.10 Caracterização fenotípica dos animais KO relacionadas ao sistema cardiovascular 63

4.11 Perfil peptídico nos diferentes tecidos 64

4.12 Ensaio de hidrólise dos peptídeos identificados como possíveis substratos da Nln 75

5 DISCUSSÃO 76

6 CONCLUSÃO 83

REFERÊNCIAS 84

1 INTRODUÇÃO

A oligopeptidase (OLIVEIRA; MARTINS; CAMARGO, 1976) neurolisina (Nln) também conhecida como EC 3.4.24.16 ou endopeptidase 24.16 é um exemplo de metalopeptidase que funciona como um monômero de massa molecular de 78 kDa e 704 resíduos de aminoácidos, capaz de hidrolisar peptídeos contendo de ~5-17 aminoácidos (BROWN et al., 2001; CHECLER et al., 1984; CHECLER; VINCENT; KITABGI, 1983; CHECLER; VINCENT; KITABGI, 1986; RAWLINGS; BARRETT, 1995; RAY et al., 2004; RAY; HINES; RODGERS, 2002; RIOLI et al., 1998).

A Nln é amplamente distribuída em tecidos de mamíferos e é encontrada em diferentes compartimentos subcelulares no cérebro de ratos (FONTENELE-NETO et al., 2001; MASSARELLI et al., 1999). A maior parte desta enzima é citosólica, no entanto, também pode ser secretada ou estar associada com a membrana plasmática (FONTENELE-NETO et al., 2001; VINCENT et al., 1996), e ainda sofrer s*plicing* alternativo e ser endereçada para as mitocôndrias (KATO et al., 1997).

Atualmente, já foram identificados mais de 100 peptídeos biologicamente ativos com tamanho que variam de 2-40 resíduos de aminoácidos (KONKOY; DAVIS, 1996). Peptídeos biologicamente ativos atuam como moléculas sinalizadoras no sistema nervoso central e periférico. Esses peptídeos são inativados ou gerados por um grupo conhecido de peptidases. Essas peptidases que participam da degradação ou modificação desses peptídeos podem estar situadas no meio intracelular, estar associadas à membrana plasmática, pode ser secretadas ou ainda está presente em mais de um desses compartimentos (CHARLI et al., 1989; VINCENT et al., 1995).

In vitro, a Nln é capaz de clivar uma série de peptídeos bioativos como, por exemplo, neurotensina, bradicinina além de gerar Met- ou Leu-encefalina a partir de vários oligopeptídeos opióides (CHECLER et al., 1984; RIOLI et al., 1998). Embora seja bem estabelecido que a Nln seja capaz de clivar vários neuropeptídios *in vitro*, e como consequência estar relacionada com funções fisiológicas importantes, o papel fisiológico desta enzima ainda é pouco conhecido (CHECLER, 2014; SHRIMPTON; SMITH; LEW, 2002).

Considerando que *in vivo* a Nln pode estar ligada a vários processos fisiológicos onde o metabolismo de peptídeos possa ser fundamental, não é difícil prever que a sua deficiência deveria gerar distúrbios fenotípicos importantes. Sendo

assim, o nosso objetivo nesse trabalho foi gerar e realizar a primeira caracterização fenotípica dos camundongos com supressão gênica para a Nln (*knockout*, KO), no intúito de analisar a relevância fisiológica da Nln.

1.1 Objetivos

Gerar camundongos *knockout* para Nln e iniciar a verificação das alterações fenotípicas dos mesmos, quando comparados com animais selvagens. Em paralelo, avaliar a relevância da Nln para o metabolismo de peptídeos, fazendo correlação com os fenótipos encontrados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As peptidases ou proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas, e como consequência atuam na degradação de proteínas e peptídeos presentes no meio intracelular e/ou extracelular. Dessa forma, além do papel na digestão alimentar, as peptidases estão envolvidas na regulação de vários processos celulares como replicação do DNA, desenvolvimento embrionário, morfogênese, angiogênese, captação alimentar, envelhecimento, apoptose, regulação do ciclo celular, formação óssea, sinalização celular, resposta imune e inflamatória, neurotrasmissão, entre outros (BARRETT, 2004; BARRETT; RAWLINGS, 2007).

2.1 Classificação das peptidases

Peptidases são classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, podendo ser endopeptidases ou exopeptidases. As exopeptidases podem ainda ser classificadas como carboxipeptidases ou aminopeptidases, hidrolisando cadeias polipeptídicas na região C-terminal ou N-terminal, respectivamente. As endopeptidases por sua vez, atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N-terminal e C-terminal. As peptidases são classificadas de acordo com o resíduo de aminoácido presente em seu sítio catalítico e envolvido na hidrólise da ligação peptídica, tais como serina, cisteína, ácido aspártico, treonina ou ácido glutâmico. Um sexto grupo de peptidases são as metalopeptidases, que apresentam no seu sítio ativo um íon metálico, geralmente Zn^{2+}, que participa do processo catalítico da ligação peptídica (BARRETT, 2004).

Em 1979, o termo oligopeptidase foi introduzido para designar um sub-grupo das endopeptidases (CAMARGO; CALDO; REIS, 1979). As oligopeptidases possuem restrições quanto ao tamanho de seus substratos, e não são capazes de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas. Como exemplos de oligopeptidases, podemos citar a prolil oligopeptidase (EC 3.4.21.26; POP), a endooligopeptidase A (EC 3.4.22.19; EOPA), a thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15; TOP) e ainda a neurolisina (EC 3.4.24.16; Nln) (CAMARGO; SHAPANKA; GREENE, 1973; CHECLER; VINCENT; KITABGI, 1983; OLIVEIRA; MARTINS; CAMARGO, 1976; ORLOWSKI; MICHAUD; CHU, 1983).

2.2 Neurolisina

A Nln é uma metalopeptidase com motivo *HEXXH* conservado que possui no seu sítio catalítico uma molécula de zinco (Figura 1) (DAUCH; VINCENT; CHECLER, 1995). A Nln foi inicialmente identificada a partir de membranas sinápticas de cérebro de ratos como sendo uma enzima capaz de clivar a neurotensina na ligação peptídica Pro-Tyr (CHECLER et al., 1984; CHECLER; VINCENT; KITABGI, 1983; CHECLER; VINCENT; KITABGI, 1986). A Nln é uma enzima monomérica com 704 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 78 kDa , sendo capaz de hidrolisar peptídeos contendo entre ~5-17 aminoácidos (BARELLI et al., 1994; BROWN et al., 2001; RAWLINGS; BARRETT, 1995; RAY et al., 2004; RAY; HINES; RODGERS, 2002; RIOLI et al., 1998).

A especificidade da Nln por peptídeos bioativos sem estrutura secundária ou terciária desenvolvidas, se deve a conformação do seu sítio ativo, que permite o acesso de apenas pequenos peptídeos por estar situado na base de um canal estreito e profundo (RAY et al., 2004; RAY; HINES; RODGERS, 2002; RIOLI et al., 2003). Através de análises bioquímicas *in vitro*, é bem estabelecido que a Nln é capaz de clivar uma série de peptídeos bioativos como por exemplo, neurotensina, bradicinina, angiotensina, hemopressinas e vários peptídeos opióides (DAUCH; VINCENT; CHECLER, 1995; RIOLI et al., 2003; RIOLI et al., 1998).

Figura 1 – Visão geral da estrutura cristalográfica da Nln.

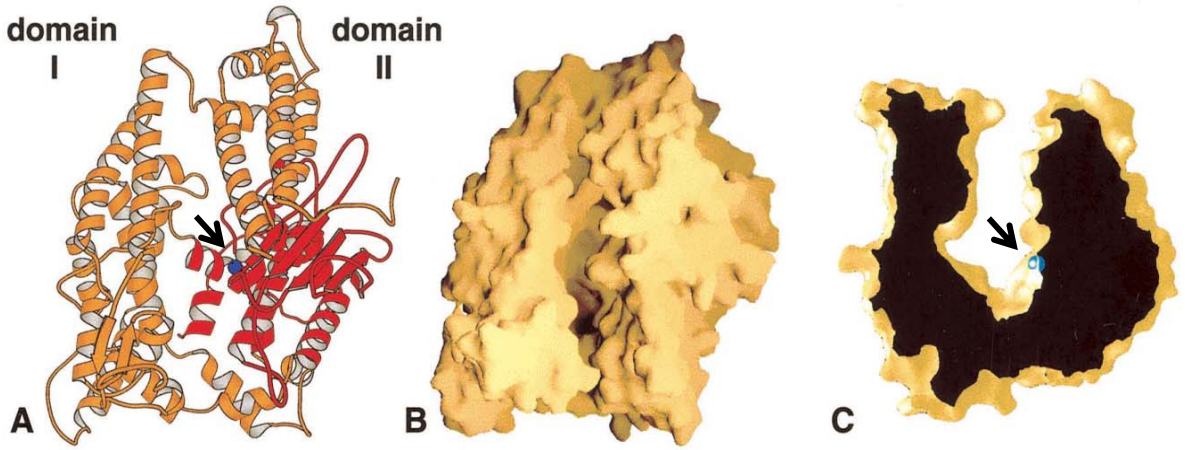

Figura 1A: Mostrando a estrutura da Nln contendo os dois domínios específicos, entre os quais se encontra o sítio catalítico contendo uma molécula de Zn^{2+} (seta). **Figura 1B:** mostrando a superfície molecular da Nln. **Figura 1C:** Vista de um corte transversal da Nln mostrando o seu sítio de ligação (molécula de Zn^{2+}, seta). (BROWN et al., 2001).

A Nln está amplamente distribuída em tecidos de mamíferos e pode ser encontrada em diferentes localizações subcelulares, que variam com o tipo celular (FONTENELE-NETO et al., 2001; MASSARELLI et al., 1999; VINCENT et al., 1996). A grande parte da enzima é citosólica, mas também pode ser secretada ou ainda pode estar associada com a membrana plasmática (FONTENELE-NETO et al., 2001; VINCENT et al., 1996), ainda, a enzima pode sofrer *splicing* alternativo e ser direcionada para as mitocôndrias (KATO et al., 1997).

Estudos de imunohistoquímica para microscopia de luz e eletrônica indicaram que no cérebro, a Nln pode ser encontrada tanto em neurônios como em células da glia (FONTENELE-NETO et al., 2001; MASSARELLI et al., 1999; VINCENT et al., 1996). Estudos em células neuroendócrinas AtT-20 e em células da glia em cultura, mostraram que a Nln pode ser secretada (GARRIDO et al., 1999; VINCENT et al., 1996). Embora possa ser secretada, a Nln não apresenta nenhum peptídeo sinal ou domínio hidrofóbico para ancora-la à membrana (KATO et al., 1997; VINCENT et al., 1996). *In vivo*, a Nln tem sido implicada, no controle da dor (BARELLI et al., 1994; DOULUT et al., 1993; JESKE et al., 2006), na regulação da pressão arterial (BLAIS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007), na sepse (PILIPONSKY et al., 2008), na reprodução (DAUCH; VINCENT; CHECLER, 1991; SHRIMPTON; SMITH; LEW, 2002), na biologia do câncer (PASCHOALIN et al., 2007) e na patogenia do acidente cardiovascular cerebral (RASHID et al., 2013); contudo, o seu verdadeiro papel *in vivo* ainda não é muito claro.

2.3 Metabolismo e funções biológicas de peptídeos intracelulares

Recentemente, estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido o envolvimento de várias proteases, peptidases e peptídeos em desordens metabólicas como resistência à insulina e obesidade (BARROS et al., 2012a; BARROS et al., 2012b; MEST; MENTLEIN, 2005; TAGORE et al., 2009). Por exemplo, animais KO para carboxipeptidase E apresentam um fenótipo de obesidade (ANUBHUTI; ARORA, 2008; FRICKER, 2007). Camundongos KO para dipeptidil peptidase-4 (DPP4) são resistentes a desenvolver adiposidade e obesidade induzida por dieta rica em gordura, além disso, esses camundongos KO para DPP4 são mais sensíveis à insulina (MEST; MENTLEIN, 2005). Esses dados sugerem que peptidases podem

desempenhar importantes funções em desordens metabólicas (TAGORE et al., 2009).

Estudos com animais transgênicos para a enzima conversora de angiotensina (ECA) contendo 1, 2 ou 3 cópias do gene ECA, mostraram que em condições normais de alimentação, animais com 3 cópias do gene da ECA consomem mais alimento para manter o mesmo peso corpóreo (HEIMANN et al., 2005). Contudo, quando desafiados com uma dieta hiperlipídica, estes animais consomem a mesma quantidade de alimento, porém, apresentam um peso corporal menor que os animais contendo 1 ou 2 cópias do gene ECA (HEIMANN et al., 2005). O tratamento com losartan, um antagonista do receptor AT1 da angiotensina II, não altera o quadro metabólico descrito acima para esses animais, sugerindo que mecanismos independentes do sistema renina-ECA-angiotensina estão relacionados às diferenças fenotípicas observadas nesses animais. Entre as alterações constatadas nesses animais, estão uma redução da atividade da Nln no tecido adiposo de animais com 3 cópias do gene da ECA, quando comparados aos animais contendo 1 cópia do gene da ECA (HEIMANN et al., 2005). Foi observado ainda que o tecido adiposo de animais contendo 3 cópias do gene da ECA tem uma composição de peptídeos intracelulares distinta daquela de animais contendo apenas 1 cópia desse gene. A maior parte dos peptídeos intracelulares identificados nos animais contendo 1 ou 3 cópias para o gene da ECA possuem um sítio de fosforilação em potencial, sendo que dois desses peptídeos foram demonstrados inibir competitivamente a fosforilação de um substrato padrão da proteína quinase C (HEIMANN et al., 2005).

Em outro modelo animal experimental, ratos Wistar foram alimentados com uma dieta padrão ou com uma dieta hipercalórica do tipo “cafeteria”, e posteriormente o conteúdo peptídico intracelular foi analisado (BERTI et al., 2012). Os animais alimentados com dieta hipercalórica tiveram um maior acúmulo de tecido adiposo epididimal, mesentérico e retroperitoneal, bem como níveis plasmáticos elevados de glicose e insulina quando comparados aos animais alimentados com a dieta padrão (BERTI et al., 2012). Dentre uma dezena de peptídeos intracelulares identificados no tecido adiposo epididimal desses animais, pelo menos dois deles aparecem em concentrações mais elevadas no tecido adiposo de animais alimentados com a dieta hipercalórica quando comparados aos animais alimentados com a dieta padrão (BERTI et al., 2012). Interessante, à introdução de peptídeos intracelulares em células 3T3-L1 foi suficiente para facilitar o transporte de glicose

estimulado por insulina (BERTI et al., 2012). Vale notar que o tecido adiposo de animais alimentados com a dieta cafeteria desenvolve tardiamente resistência à insulina, em relação ao tecido muscular (PRADA et al., 2005). Desta forma, é possível que o aumento de peptídeos intracelulares esteja relacionado aos processos celulares responsáveis pela resistência à insulina tardia, que é observada no tecido adiposo de animais alimentados com a dieta cafeteria (BERTI et al., 2012). Em conjunto, esses resultados levam a sugestão que tanto a Nln como os peptídeos intracelulares poderiam participar fisiologicamente de processos metabólicos essenciais, como aqueles relacionados ao metabolismo de gordura e à captação de glicose.

Estudando os aspectos bioquímicos e celulares da thimet oligopeptidase (EP24.15), foi desenvolvido um novo método para identificação de novos peptídeos, substratos e/ou inibidores competitivos dessa enzima (RIOLI et al., 2003). Esse método baseia-se em uma mutação, sítio-dirigida, em resíduos específicos de amino ácidos de seu sítio catalítico, o que torna a enzima EP24.15 inativa. Sendo assim, extratos peptídicos podem ser incubados com a enzima inativa e os seus substratos e/ou inibidores competitivos, podem ser identificados por espectrometria de massas (RIOLI et al., 2003). Dentre os peptídeos identificados com essa metodologia de “captura de substratos”, um peptídeo que é fragmento da cadeia alfa da hemoglobina contendo 9 resíduos de aminoácidos, denominado de hemopressina (PVNFKFLSH), foi identificado como um ótimo substrato das EP24.15, Nln e ECA (RIOLI et al., 2003).

A hemopressina possui um efeito hipotensivo na pressão arterial de ratos anestesiados (RIOLI et al., 2003). Além disso, estudos farmacológicos demonstraram que esse peptídeo é um agonista inverso de receptores canabinóides do tipo 1 (HEIMANN et al., 2007). Esse peptídeo tem demonstrado outras funções biológicas, sendo capaz de inibir a resposta de hipernocicepção periférica (DALE et al., 2005), e ainda funciona oralmente como supressor do apetite (DODD et al., 2010). Mais recentemente, outro peptídeo denominado de AGH (AGHLDDLPGALSAL), também fragmento da cadeia alfa da hemoglobina, foi capaz de inibir a resposta hiperalgésica inflamatória periférica através da ativação indireta de receptores opióides do sub-tipo mu (RIBEIRO et al., 2013).

Nosso grupo também investigou o papel de peptídeos intracelulares como moduladores de interações proteína-proteína, através de experimentos utilizando a

técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Alguns peptídeos investigados neste último estudo modularam *in vitro* a interação das proteínas 14.3.3ε e calmodulina (CaM) com proteínas de extrato protéico de cérebro de camundongos e com a proteína EP24.15. Um destes peptídeos, o VFDVELL aumenta a concentração de cálcio citosólico de uma maneira dose dependente, somente quando introduzido nas células HEK293 (RUSSO et al., 2012a).

2.4 Metabolismo energético

Um dos mecanismos metabólicos homeostáticos mais estritamente regulados no corpo ocorre para manter os níveis plasmáticos de glicose dentro de intervalos fisiológicos. Essa função é regulada, principalmente, por dois hormônios do sistema endócrino pacreático, a insulina e o glucagon, que atuam nos seus tecidos alvos para ajustar o metabolismo da glicose. A insulina é secretada quando se tem níveis elevados de glicose no sangue, por exemplo, no período pós-pandrial. Por outro lado, o glucagon é secretado sob baixas concentrações de glicose no sangue, como observado no período de jejum (HIROTA; FUKAMIZU, 2010).

O corpo humano possui a capacidade de regular as mudanças no balanço energético resultante do jejum, ingestão de alimentos e de outras atividades cotidianas. O corpo mantém a homeostase energética controlando uma série de reações metabólicas baseado nas condições corporais normais ou em casos de doenças neurológicas ou endócrinas, por exemplo. O corpo deve manter o metabolismo energético, independente da condição. Vários estudos notáveis têm sido realizados relacionados ao metabolismo energético, juntamente com o rápido avanço nas pesquisas básicas sobre síndromes metabólicas, que estão associadas a um desbalanço energético (HIROTA; FUKAMIZU, 2010).

A incidência populacional da obesidade e da diabetes mellitus está aumentando cada vez mais em vários países. Dieta e exercícios são os melhores tratamentos não farmacológicos para o controle dos níveis de glicose plasmático (ZISSER et al., 2011). Embora, a falta de exercício diminua as funções musculares e dos ossos, e também aumenta o acúmulo de gordura (CHAOLU et al., 2011), a prática de exercício físico é capaz de melhorar vários processos fisiológicos como funções cardiovasculares, massa corpórea, níveis de glicose no sangue e sensibilidade à insulina (BANFI et al., 2012; ZISSER et al., 2011).

A insulina regula o metabolismo de glicose através do aumento da captação de glicose no músculo estriado esquelético e no tecido adiposo, e diminui os níveis de produção de glicose hepática bloqueando gliconeogênese e glicogenólise (SALTIEL; KAHN, 2001). Contudo, em torno de 80% da captação de glicose ocorre no músculo estriado esquelético, sendo assim este tecido é considerado o maior sítio de captação de glicose nos mamíferos (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009; THIEBAUD et al., 1982).

Os níveis de glicose são controlados para atender as demandas de energia durante o ciclo da alimentação nos animais. Embora a gordura e as proteínas possam ser utilizadas a partir do tecido adiposo e do músculo, para o fornecimento de energia para vários órgãos durante o período prolongado de fome, as células vermelhas do sangue e o cérebro dependem principalmente da glicose como fonte de combustível (JITRAPAKDEE, 2011).

Durante as condições de alimentação, a insulina é secretada pelas células β pancreáticas em resposta aos níveis de glicose plasmático através de um mecanismo que detecta os níveis aumentados de glicose no período pós-prandial (JITRAPAKDEE, 2011; MAECHLER; WOLLHEIM, 2001). A rápida ligação da insulina aos seus receptores na membrana plasmática das células dos tecidos alvos, como músculo estriado esquelético, tecido adiposo e fígado, resulta na rápida absorção de glicose por esses tecidos (SALTIEL; KAHN, 2001).

O processo de sinalização da insulina é mediado por uma rede altamente complexa e integrada de fatores. A insulina liga-se ao receptor específico de membrana, formado por uma proteína heterotetramérica com atividade quinase. A subunidade α do receptor inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β, sendo assim, a ligação da insulina na subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase, resultando uma alteração conformacional e autofosforilação. O resultado final é a fosforilação de múltiplos sítios de substratos do receptor de insulina (IRS) (PATTI; KAHN, 1998). A fosforilação em tirosina das proteínas substratos dos receptpres de insulina se tornam sítios de ancoragem para proteínas contendo domínios com homologia a Scr2 (SH2). Dentre essas proteínas podemos citar a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que após a sua ligação com a subunidade p110 na membrana plasmática resulta na liberação de fosfoinositol-3-fosfato. Esse promove a ativação da serina/treonina proteína

quinase AKT (AKT), induzindo o transporte de glicose para dentro da célula (KAHN; FLIER, 2000).

A ligação da insulina ao seu receptor induz o transporte de glicose para dentro da célula através da translocação da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4). O GLUT4 pertence a uma família de 12 diferentes tipos de facilitadores de transporte, sendo o GLUT4 o único transportador predominantemente armazenado no compartimento intracelular (KANZAKI, 2006; WATSON; PESSIN, 2001). Uma vez que ocorre a ligação da insulina ao seu receptor, esse processo promove a translocação de GLUT4 para membrana plasmática, como consequência, ocorre um aumento da exocitose de vesículas contendo esse transportador GLUT4 e consequentemente um aumento da absorção de glicose nos tecidos alvos, principalmente tecido muscular e adiposo. Após a finalização do estímulo causado pela insulina, GLUT4 é internalizado por endocitose dependente de clatrina e redirecionado para compartimentos intracelulares de armazenamento (KANZAKI, 2006; SALTIEL; KAHN, 2001; WATSON; PESSIN, 2001).

2.5 Gliconeogênese

A homeostase da glicose é altamente regulada para atender a demanda energética durante o período de alimentação e jejum. Embora a gordura e as proteínas possam ser utilizadas a partir do tecido adiposo e do músculo, respectivamente, para o fornecimento de energia para vários órgãos, durante o período prologado de jejum, as células vermelhas do sangue e o cérebro necessitam principalmente de glicose como fonte de combustível energético (JITRAPAKDEE, 2011). Durante o período prologado de jejum, quando os níveis de glicose estão baixos, as células α do pâncreas secretam glucagon estimulando a utilização da gordura do tecido adiposo pelo músculo, as moléculas de lipídeos sofrem β-oxidação para liberação de energia. O glicerol liberado através da lipólise, os aminoácidos liberados a partir de proteínas quebradas no músculo e o lactato gerado no músculo e nas células vermelhas do sangue, são transportados da circulação para o fígado, onde irão servir de substratos durante a gliconeogênese. No fígado, o glucagon estimula a produção a curto prazo de glicose via glicogenólise, e ao mesmo tempo a produção a longo prazo de glicose via gliconeogênese. A glicose produzida por

essas duas vias fornece combustível para as células vermelhas do sangue e para o cérebro durante o jejum (JIANG; ZHANG, 2003).

A gliconeogênese pode ser definida como a formação de glicose a partir de precursores não carboidratos, tais como piruvato, lactato, glicerol e aminoácidos glicogênicos. Essa via ocorre principalmente no fígado, sendo essencial para a vida e ocorrendo durante o período prologado de jejum (JITRAPAKDEE, 2011). Além disso, a gliconeogênese desempenha um papel importante na eliminação do lactato, e na manutenção da glicose durante o exercício físico. As enzimas envolvidas nos processos de gliconeogênese bem como de glicólise são bem reguladas para que uma dessas duas reações predomine, de acordo com as condições fisiológicas. A gliconeogênese requer quatro enzimas essenciais para a sua realização. Essas 4 enzimas gliconeogênicas são: glicose-6-fosfatase (G6Pase); frutose 6-bisfosfatase (FBPase1); piruvato carboxilase (PC) e a fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinase (PEPCK-C) (CORSSMIT; ROMIJN; SAUERWEIN, 2001).

Figura 2 – Esquema representativo das vias gliconeogênicas no fígado.

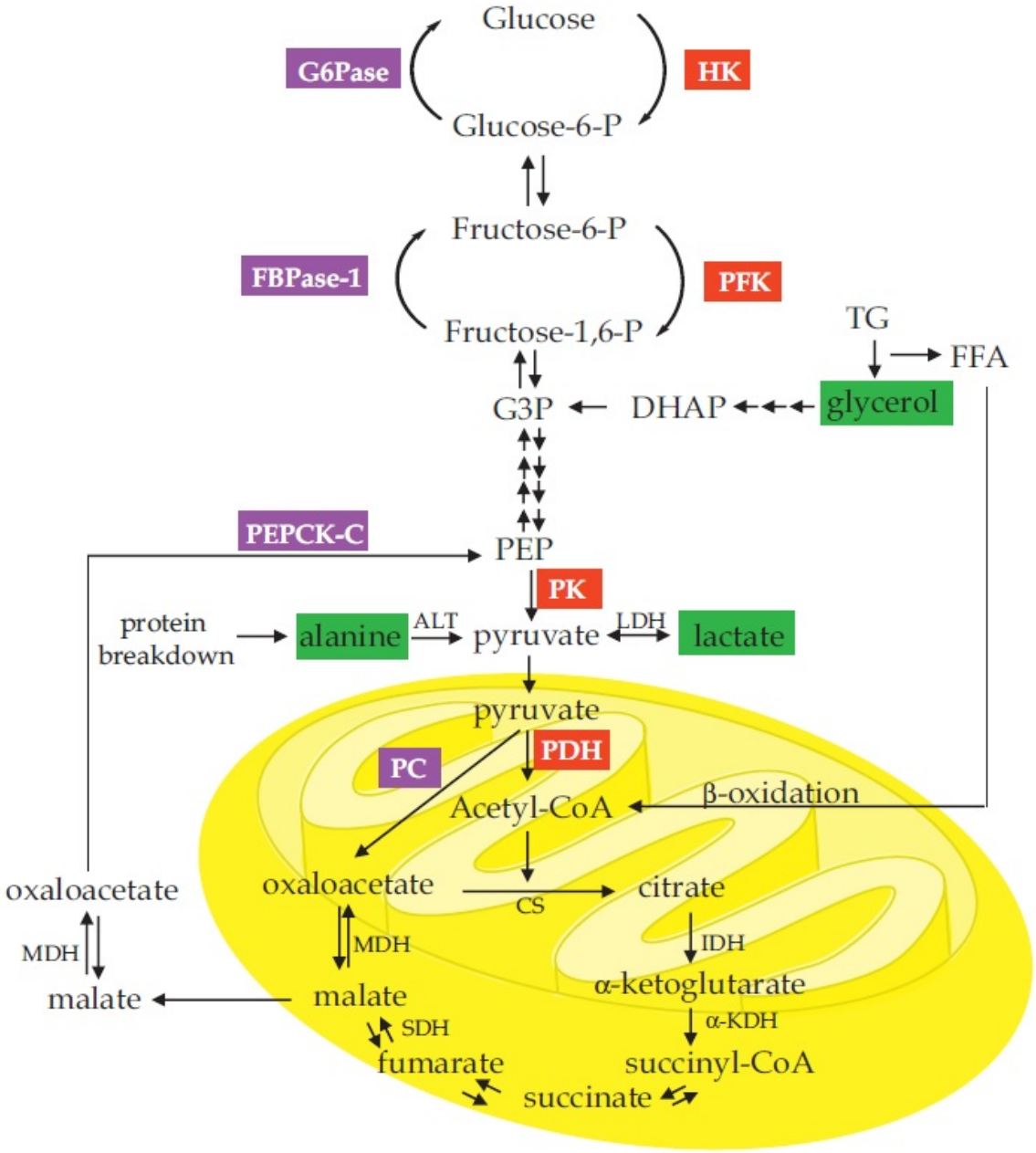

Figura 2: Representação esquemática da via de gliconeogênese mostrando as principais enzimas envolvidas nessa via (roxo): glicose-6-fosfatase (G6Pase); frutose 6-bisfosfatase (FBPase1); piruvato carboxilase (PC) e a fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinase (PEPCK-C) (JITRAPAKDEE, 2011).

A PC faz parte da primeira reação da gliconeogênese, onde converte o piruvato a oxalacetato (JITRAPAKDEE, 2011). Essa enzima desempenha ainda, papéis não gliconeogênicos, incluindo lipogênese e gliceroneogenese no tecido adiposo branco, e a síntese de glutamato nos astrócitos (HERTZ et al., 1999; RESHEF et al., 2003).

A PEPCK-C é responsável pela conversão de oxalacetato em fosfoenolpiruvato. Existem duas formas de PEPCK-C, uma mitocondrial e uma citosólica, que são codificadas por dois genes diferentes. A forma mitocondrial converte o oxalacetato formado nas mitocôndrias em PEP. No caso da outra enzima, o oxalacetato é primeiro convertido em malato, transportado para o citosol, convertido novamente em oxalacetato onde é substrato da PEPCK-C citosólica. A PEPCK-C mitocondrial está mais diretamente relacionada para auxiliar na gliconeogênese a partir do lactato, enquanto a PEPCK-C citosólica está mais relacionada com a gliconeogênese a partir de aminoácidos glicogênicos (HANSON; RESHEF, 1997).

A FBPase converte a frutose 1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato. Existem duas formas de FBPases codificadas por genes diferentes, sendo uma forma expressa no músculo e a outra no fígado (O'BRIEN; GRANNER, 1991).

A G6Pase converte a glicose-6-fosfato em glicose na etapa final da gliconeogênese. A glicose é então transportada através da membrana plasmática e liberada na circulação. G6Pase é expressa predominantemente no fígado e nos rins, mas também é expressa em níveis mais baixos no intestino (HUTTON; O'BRIEN, 2009).

A regulação da gliconeogênese hepática pode ser controlada através de mecanismos pré e pós translacionais, através da regulação da oferta de substratos, regulação alostérica da atividade da enzima bem como é regulada por fatores pré translacionais capazes de ativar ou inibir a ativação de genes que codificam enzimas da gliconeogênese (KLOVER; MOONEY, 2004).

A Creb1 (proteína ligante ao elemento responsivo de AMP cíclico) apresenta uma expressão tecidual ubíqua, e pode ser ativada durante períodos prologandos de jejum (MAYR; MONTMINY, 2001). Durante o período de jejum, as células α pancreáticas secretam glucagon em resposta aos baixos níveis de glicose plasmáticos. Uma vez alcançando os hepatócitos, o glucagon liga-se a receptores acoplasdos a proteínas G (GPCRs) e promove a troca GDP/GTP. Este por sua vez, ativa a adenilato ciclase que está ligada à membrana que catalisa a conversão de ATP para AMP cíclico (cAMP). O aumento do cAMP intracelular estimula a dissociação das subunidades catalisadoras e regulatórias da proteína quinase A (PKA) (AUTHIER; DESBUQUOIS, 2008). A subunidade catalítica de PKA entra então no núcleo, onde é capaz de fosforilar Creb1 na serina 133 e convertendo-o

para a sua forma transcricional ativa. A Creb1 fosforilada é capaz de se ligar ao elemento responsivo de cAMP localizado no promotor dos seus genes alvos (MAYR; MONTMINY, 2001). Contudo, Creb1 sozinho não produz seu efeito máximo na ativação transcricional, sendo necessário que Creb1 se ligue ao regulador transcricional coativador de Creb2 (CRTC2/TORC2), que tem sido demostrado como um regulador chave na homeostase da glicose durante o período de jejum (KOO et al., 2005).

A glicoquinase (Gck) é considerada como uma das mais importantes enzimas na manutenção dos níveis fisiológicos de glicose nos seres humanos. Gck é expressa principalmente no pâncreas e no fígado, desempenhando um papel chave na liberação de insulina estimulada pela glicose (SARABU; GRIMSBY, 2005). Gck, também conhecida como hexoquinase 4, é uma das quatro hexoquinases que catalisa a fosforilação de glicose em glicose-6-fosfato utilizando ATP e Mg^{2+}. O seu papel funcional nas células β pancreáticas bem como nos hepatócitos está bem estabelecido, contudo, em células neurais e neuroendócrinas, a sua função não é bem conhecida. Nas células β pancreáticas Gck funciona como um sensor molecular para liberação de insulina estimulada pela glicose (SARABU; GRIMSBY, 2005).

No fígado, Gck é controlada por glicoquinases regulatórias, e funciona como um inibidor competitivo formando um complexo com Gck na presença de frutose 6-fosfato, e assim Gck é sequestrada para seu estado inativo no núcleo. A frutose-1-fosfato reduz a ação inibitória das glicoquinases regulatórias, permitindo a translocação de Gck para o citoplasma, tornando Gck ativa e facilitando o metabolismo da glicose (VAN SCHAFTINGEN, 1989). Gck também exerce um maior controle no metabolismo hepático da glicose, tornando-se uma enzima altamente importante tanto no estado alimentado como no jejum, por influenciar a absorção e a produção de glicose, respectivamente (AGIUS et al., 1996).

2.6 Músculo esquelético e plasticidade muscular

O músculo esquelético compreende aproximadamente 40% da massa corporal total nos mamíferos. Ainda, o músculo esquelético é responsável por cerca de 30% da taxa metabólica de repouso e que corresponde a 60-75% das despesas de energia diária do humano adulto (ZURLO et al., 1990). Além disso, o músculo esquelético tem um papel crítico no controle glicêmico e na homeostase metabólica,

e é o local predominante para absorção de glicose sob estímulo da insulina (DEFRONZO et al., 1981). Adicionalmente, o músculo esquelético é o maior órgão de armazenamento de glicogênio, com capacidade, aproximada quatro vezes maior que o fígado (EGAN; ZIERATH, 2012). Uma única sessão aguda de exercício físico é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina em todo o corpo, até mesmo 48 horas após o término do exercício. Ainda, o exercício físico aumenta a absorção de glicose pelo músculo esquelético, através de uma via independente de insulina, indicando que o músculo esquelético promove grande impacto sobre a homeostase da glicose (EGAN; ZIERATH, 2012; KOOPMAN et al., 2005; LEE; HANSEN; HOLLOSZY, 1995).

O músculo estriado esquelético é composto por um conjunto heterogêneo de fibras musculares especializadas que permite o corpo se manter em postura e realizar uma série de movimentos. É justamente essa diversidade de miofibras que permitem diferentes grupos musculares promoverem uma diversidade de funções. Além da sua função esquelética na mobilidade os músculos esqueléticos desempenham um papel central no controle do metabolismo corporal. Estas funções são controladas por vias de sinalização que permitem as fibras musculares responderem às mudanças metabólicas e às exigências funcionais do organismo de formas originalmente distintas (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006).

A premissa da remodelação de miofibrilas musculares foi demonstrada há 45 anos, através do intercruzamento de inervação, que alterava a contractilidade e as propriedades das miofibras. Da mesma forma, as fibras musculares respondem ao exercício de treinamento físico remodelando as suas características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas. De uma maneira geral, a remodelação das fibras musculares ocorre como uma resposta adaptativa que serve para manter um equilíbrio fisiológico do corpo (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006). Muitos dos processos de remodelação muscular ocorrem pela ativação de sinalização intracelular, reprogramação genética, alteração da massa muscular ou das propriedades contrácteis e do metabolismo do corpo. Avanços na engenharia genética têm permitido facilitar o entendimento e a compreensão da remodelação das fibras musculares, facilitando o entendimento dos mecanismos moleculares da sinalização celular durante a que ocorre nesse rearranjo das fibras musculares (BULLER; ECCLES; ECCLES, 1960). Por exemplo, muitos estudos com animais transgênicos ou *knockout* têm demonstrado vários resultados importantes nesse

processo. A ativação ou inibição de diversas proteínas ou outros fatores têm demonstrado ser capaz de alterar o estado metabólico das fibras musculares, bem como alterar o desempenho do músculo como um todo (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006; BUCKINGHAM et al., 2003).

A musculatura do corpo é composta por uma grande variedade de grupos musculares, tais como sóleo, gastrocnêmio, músculo extensor longo do dedo, tibial anterior, entre outros. Cada grupo muscular é composto por um conjunto heterogêneo de miofibras e cada tipo de fibra possui características que diferem, por exemplo, na velocidade de contractilidade bem como na resistência a fadiga. Assim, como mencionado acima, uma característica marcante das miofibras é a capacidade de se transformar e remodelar em resposta aos estímulos ambientais (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006).

Embora histologicamente o músculo apareça de maneira uniforme, ele é composto por miofibras totalmente distintas e com características e funções diferentes. Inicialmente, as fibras musculares foram divididas em fibras do tipo I e fibras do tipo II. Enquanto as fibras do tipo I apresentavam alta atividade oxidativa e baixa atividade glicolítica, as fibras do tipo II apresentavam características contrárias (DUBOWITZ; PEARSE, 1960).

Com base nas isoformas das cadeias pesadas de miosina, as miofibras podem ser classificadas em tipo I, tipo IIa, tipo IIx e tipo IIb. As fibras do tipo I, também são denominadas de fibras de contração lenta, enquanto as fibras do tipo II também são denominadas de fibras de contração rápida. As fibras do tipo I são mais resistentes a fadiga, possuem uma alta atividade oxidativa e são ricas em mitocôndrias (PETTE; STARON, 2000; SCHIAFFINO; REGGIANI, 1996). Enquanto as fibras do tipo II, são menos resistentes a fadiga, apresentam uma elevada capacidade glicolítica e são pobres em mitocôndrias. Outra característica discriminatória importante, é que enquanto as fibras lentas estão mais relacionadas com a postura e com tarefas que envolvem resistência, as fibras rápidas estão mais relacionadas com tarefas que envolvem força e velocidade (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Geração e caracterização de camundongos *knockout* para Nln

Os camundongos *knockout* para a Nln (KO) foram gerados utilizando a tecnologia *Gene Trap* a partir de blastocisto (NPX481) micro-injetado em C57BL/6 contendo modificação nas células tronco embrionárias (129ola) obtidas da *Baygenomics* através do consórcio internacional *Gene Trap* (IGTC). A modificação genética no alelo da Nln apresenta o vetor *Gene Trap* pGT1dTMpfs inserido entre os *exons* 1-2 (Figura 3), (todos os detalhes dessas células tronco embrionárias podem ser encontrados no web site: http://www.genetrap.org/cgi-bin/annotation.py?cellline=NPX481).

Figura 3 – Representação da estrutura do gene da Nln e da localização do vetor *Gene Trap* (pGT1dTMpfs).

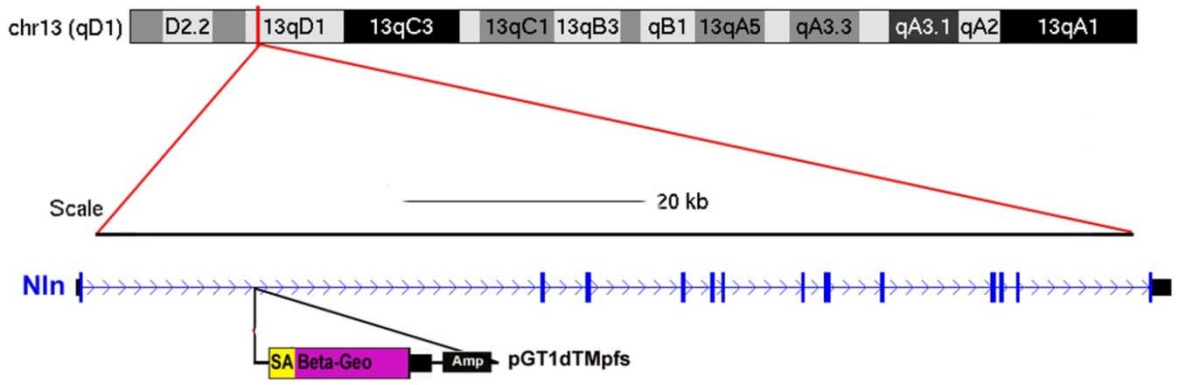

Figura 3: Representação da estrutura do gene da Nln e da localização do vetor *Gene Trap* (pGT1dTMpfs). A linha vertical vermelha representada no esquema indica a posição do locus da Nln no cromossomo 13 do camundongo (chr13-qD1). Os *exons* são representados como blocos conectados por setas, onde os blocos azuis indicam a região codificante e os blocos pretos à região não codificante. O vetor *Gene Trap* (pGT1dTMpfs) está inserido entre os *exons* 1-2.

As células tronco embrionárias contendo o *Gene Trap* injetadas em blastocisto de C57BL/6 foram transferidos para fêmeas pseudográvidas. Após a transmissão do alelo *knockout* para quimera da geração F1, camundongos KO foram obtidos a partir da reprodução heterozigótica e mantidos posteriormente por meio de seleção (genotipagem) de cruzamento de camundongos heterozigotos. Para obter esses camundongos em um fundo genético puro, os animais obtidos na F1

(129/OlaHsd/C57BL/6 fundo) foram cruzados com C57BL/6 por 10 gerações consecutivas (Figura 4).

Figura 4 – Esquema tradicional de *backcross* para limpeza do *background* genético e geração de camundongo congênito, a partir de comundongos *knockout* (129ola/Nln$^{-/-}$, contendo o inserto *gene trap*) e um C57BL/6.

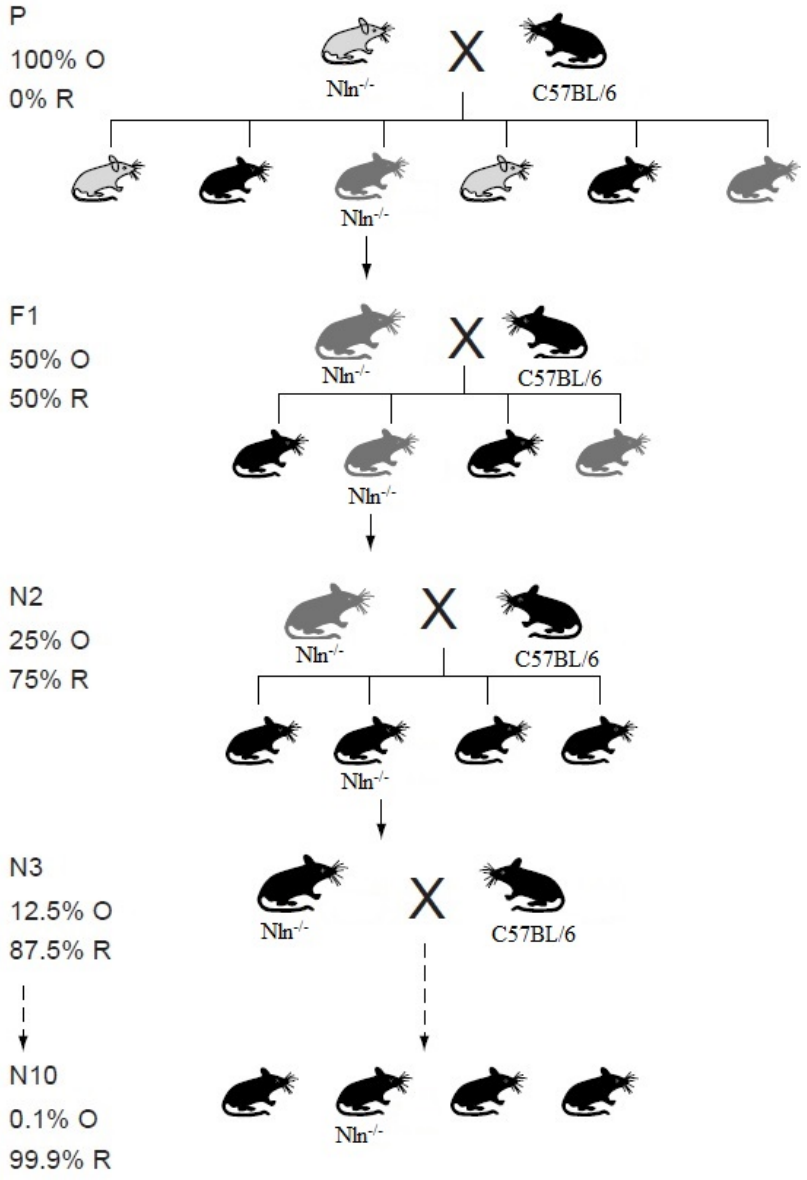

Figura 4: Esquema tradicional de *backcross* para limpeza do *background* genético e geração de camundongo congênito. Iniciando com comundongo *knockout* (129ola/Nln$^{-/-}$, contendo o inserto *Gene Trap*) e um C57BL/6. Os animais gerados a partir desse cruzamento em F1 já apresentam 50% do material genético do animal de origem e 50% do animal destinatário. O resultado obtido no décimo cruzamento são animais com 99,9% de material genético do C57BL/6. Em cada cruzamento os descendentes são genotipados de modo a identificar os animais *knockout*. O escurecimento gradual da pelagem do camundongo representa o aumento gradual do conteúdo C57BL/6.

Os animais foram mantidos em gaiolas IVC (*Tecniplast Deutschland*) sob condições padronizadas com um ciclo artificial claro-escuro de 12 horas em uma temperatura ambiente de 25 °C, com ração padrão (0,25% de sódio) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos, com 24 semanas de idade. Todos os procedimentos experimentais descritos nesse projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, protocolo registrado sob o número 44, página 86 no livro 02.

3.2 Microssatélites

Após o cruzamento por 10 gerações consecutivas dos animais *knockout* para Nln com C57BL/6 (WT), o DNA total obtido da cauda dos camundongos foi coletado e enviado para o laboratório da Jackson (Main ST, Bar Harbor, EUA) para análise de microssatélites por reação de PCR para monitoramento do *background* genético.

Inicialmente, aproximadamente 1 cm da cauda do camundongo foi removido e mantido em nitrogênio líquido até a extração de DNA. No momento da extração de DNA, a biópsia da cauda foi macerada e em seguida o material foi colocado em um eppendorf com 200 µL de tampão de lise com proteinase K (Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, SDS 0,2%, proteinase K 1 mg/mL) e incubado por 2 horas a 65 °C e em seguida mais 200 µL de tampão de lise sem proteinase K foi adicionado. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12000 xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e colocado em um novo tubo. Foram adicionados 840 µL de etanol absoluto gelado, acetato de sódio 1M (800 µL de etanol absoluto mais 40 µL de acetato de sódio/amostra) e as amostras foram centrifugadas 5000 xg por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e em seguida o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. O sobrenadante foi novamente desprezado e o tubo foi invertido até ficar completamente seco. Foram adicionados 200 µL de tampão Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM (TE). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 30 minutos para dissolver o sedimento de DNA, e as amostras foram quantificadas em aparelho *NanoDrop* 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Por fim, as amostras foram enviadas ao laboratório Jackson (Main ST, Bar Harbor, EUA) para verificação dos microssatélites.

Em média foram verificados de 5-10 microssatélites nos 19 cromossomos das 14 amostras de DNA que foram enviadas. Para análise, foi comparada as amostras enviadas com as amostras controles de DNA puro das linhagens de camundongo C57BL/6, 129ola e um mix dessas amostras.

3.3 Extração de DNA e genotipagem

Para genotipagem (identificação dos animais KO por PCR convencional), amostras de DNA foram extraídas da cauda dos camundongos, como descrito acima, e submetidas a PCR convencional utilizando os *primers* NlnF3 (5'-CGCCTCCTGCACCTACCA) e pNlnwtR3 (5'-ATTTGCCAGGTTAAGAGATCG) para região codificadora da Nln e NlnF3 (5'-CGCCTCCTGCACCTACCA) e pNlnkoR2 (5'-CGTGTCCTACAACACACACTCC) para o alelo *knockout* Nln.

As PCRs foram realizadas utilizando 2 µL dos extratos de DNA, 3 µL PCR Buffer 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 MM $MgCl_2$; 0,01% (w/v) galatina), 1 µL $MdCl_2$ 50 mM, 1 µL de dNTP 5 mM, 0,5 µL de cada *primer* 10 µM e 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5 u/µL para um volume final de reação de 30 µL. As reações foram submetidas a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, encerrando com 72 °C por 5 minutos. Os produtos das reações de PCR foram aplicadas em géis de agarose 2% contendo brometo de etídeo, visualizadas e fotografadas/digitalizadas sob luz ultravioleta.

3.4 Peso e composição corpórea

Os animais foram pesados em uma balança convencional e após o sacrifício, diversos tecidos foram removidos, pesados e normalizados por grama de peso corpóreo de cada animal. A composição corpórea (água livre, gordura e massa muscular) foi estimada em animais de 6 meses de idade por absorciometria de raios-x de dupla energia usando Hologic QDR 4500 *scanner* como previamente descrito (CASTRO et al., 2004).

3.5 Teste de tolerância a glicose, insulina e piruvato

Para o teste de tolerância à glicose (GTT), os animais foram mantidos em jejum de 12 horas, pesados e uma gota de sangue obtida da cauda dos animais foi retirada para determinação da glicemia utilizando o glicosímetro Accu-Check Performa (Roche). Posteriormente, 2 g de glicose/kg de peso corporal foi injetada na cavidade peritoneal e a glicemia foi aferida nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose.

Para o teste de tolerância a insulina (ITT), foram realizados os mesmos procedimentos do teste de tolerância a glicose, contudo, foi injetada insulina na dose de 0,75 UI/kg de peso corporal e a glicemia foi aferida nos mesmos tempos do GTT. Os resultados foram expressos em % de redução de glicose no sangue.

Os testes de tolerância ao piruvato foram realizados de forma similar ao GTT e ITT, sendo que foram injetados 2 g de piruvato/kg de peso corporal em animais previamente submetidos a jejum de 16 horas.

3.6 Extração de proteínas

Após o sacrifício dos animais por decaptação, foram coletadas amostras de músculo estriado esquelético (gastrocnêmio e sóleo), tecido adiposo epididimal e fígado. Essas amostras foram imersas em nitrogênio líquido até o uso. As amostras foram homogeneizadas nos devidos tampões para atividade enzimática ou *Western blotting* como será descrito abaixo. Os extratos foram então centrifugados a 4 °C, por 10 minutos a 14000 xg. O sobrenadante foi coletado e o pellet descartado. A determinação da concentração de proteínas nas amostras foram realizadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) ou pelo método do reagente de Bradford, medido em comprimentos de onda de 562 nm ou 595 nm, respectivamente, em um espectrofluorímetro, e os valores foram expressos em µg de proteína por µL (µg/µL). As amostras foram então reajustadas para mesma concentração de proteínas e congeladas em freezer -80 °C até o momento do uso. No caso da atividade enzimática, todos os ensaios foram realizados a fresco.

3.7 Atividade enzimática

A atividade enzimática da Nln foi determinada em triplicatas usando um ensaio contínuo com substrato fluorescente (QFS; 7-methoxycoumarin-4-acetil-P-L-

G-P-dK-(2,4-dinitrophenyl) como previamente descrito (RIOLI et al., 1998). Resumidamente, 40 µg de extrato protéico de músculo estriado esquelético (gatrocnêmio e sóleo), fígado e tecido adiposo epididimal previamente homegeneizado em 200 µL de TBS (25 mM de TRIS acrescido de BSA (1 mg/ml) e 1 mM do substrato QFS, na presença ou ausência do inibidor específico da Nln (Pro-Ile, 5 mM), usado para discernir a atividade atribuída exclusivamente a Nln nos diferentes órgãos analisados. A fluorescência foi monitorada em um espectrofluorímetro (Molecular Devices, Sunyale, CA, EUA) (para placa de 96 poços nos comprimentos de onda de 319 nm (excitação) e 418 nm (emissão). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) por minuto normalizados pela concentração de proteínas.

3.8 *Western blotting*

Para avaliar a ativação da sinalização da glicose *in vivo*, foram realizados ensaios de *Western blotting* para detecção de AKT total e pAKT. Primeiramente, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas. A glicose basal foi aferida como já descrito no teste de tolerância a glicose. Insulina na dose de 5 UI/kg de peso corporal, foi injetada por via intravenosa. Amostras de fígado, de tecido adiposo epididimal e músculo esquelético (gastrocnêmio) foram coletados 5 minutos depois da injeção intravenosa de insulina e rapidamente armazenados em nitrogênio líquido.

Para as análises por *Western blotting* inicialmente foram extraídas proteínas dos diferentes tecidos (gastrocnêmio, tecido adiposo epidimal e fígado), homogeneizados em tampão RIPA (Sigma, ST. Louis, Missouri, EUA) contendo inibidores de protease (Roche, Indianopolis, IN, EUA) e de fosfatases (Roche, Indianopolis, IN, EUA). Os extratos foram quantificados, e diluídos em tampão RIPA e tampão de amostra 4x. Em seguida as amostras foram fervidas por 10 minutos e em seguida armazenadas no -80 °C até o uso.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% no aparato de eletroforese Bio-Rad (Mini-Protean). Foi então realizada a transferência das proteínas para uma membrana PVDF (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) por 2 horas, com uma corrente constante de 0,25 mA à 4 °C em aparato de eletroforese Bio-Rad (Mini-Protean). A membrana de PVDF foi

pré-incubada por 2 horas com tampão de bloqueio inespecífico (Odyssey, LI-COR-Biosciences) e então incubada com anticorpos policlonais de coelhos anti-pAKT (Ser473), anti-AKT ou anti-GAPDH (Cell Signaling) *overnight*, a 4 °C, de acordo com as especificações do fabricante. Por fim as membranas foram incubadas com anticorpo secundário feito em coelho IRDye (Odyssey, LI-COR-Biosciences) e então visualizadas no *Odyssey Infrared Imaging System* (Odyssey, LI-COR-Biosciences). A densitometria para a quantificação das bandas foram realizadas usando o *Odyssey Infrared Imaging software* (Odyssey, LI-COR-Biosciences).

3.9 *Real-time* PCR

Foram realizados experimentos de *real-time* PCR (qPCR) para determinar a expressão de mRNA de genes relacionados a gliconeogênese no fígado, bem como de genes específicos para diferentes tipos de fibras musculares. Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e sacrificados por decapitação. Os tecidos foram rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido e estocados em -80 °C até o uso. Todas as amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído usando Trizol (*TRIzol,* Life Technologies, Rockville, MD, EUA). Depois da extração de RNA, todas as amostras foram purificadas e tratadas com DNAse usando RNeasy Mini Kit (Qiagen, Foster City, CA, EUA). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta.

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1 mg de RNA total com *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) usando nucleotídeos hexameros randômicos. As curvas padrão de todos os *primers* foram feitas para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvos e de referência. PCR quantitativo foi realizado usando o sistema de detecção de sequência Prism 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com 100 nM de *primer* e 20 ng de cDNA. A expressão de mRNA alvos foi normalizada pela expressão de GAPDH e expressas como valores relativos utilizando o método (2 DDCt) de acordo com as instruções de fabricante. Os níveis de expressão de genes alvo de interesse foram normalizados pelos animais selvagens controles.

3.10 Teste de esforço progressivo em esteira

A capacidade de exercício, estimada pela distância percorrida total, correlaciona-se com a capacidade de trabalho do músculo esquelético. Aqui, a capacidade de exercício dos animais foi avaliada usando uma esteira graduada. Resumidamente, inicialmente os animais foram adaptados para realização do exercício físico por uma semana (realizando exercício de corrida, aproximadamente 10 minutos por sessão diária). Antes do teste os animais foram colocados na esteira com raias e deixados por 30 minutos para melhor adaptação com o ambiente. Foram realizados dois testes de esforço progressivo (teste de alta e baixa intensidade).

No teste de alta intensidade: a velocidade da esteira foi aumentada gradualmente em 3 m/minuto a cada três minutos, até a exaustão dos animais. Exaustão foi definida como o tempo em que os animais foram incapazes de se manter em ritmo na esteira por aproximadamente 1 minuto. Então, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) distância pecorrida, 2) tempo de corrida e 3) velocidade máxima atingida.

No teste de baixa intensidade, para uma capacidade máxima de exercício físico em baixa intensidade, uma média da velocidade máxima atiginda de todos os animais no teste de corrida de alta intensidade foi calculado, e 70% do valor da velocidade máxima obtida dos animais no teste de alta intensidade (equivalente a 21 m/min) foi utilizado para realização do teste de baixa intensidade. Após um período de aquecimento, todos os animais foram colocados para correr na esteira com velocidades constantes de 21 m/min até a exaustão. A exaustão foi definida como descrito acima no teste de alta intensidade.

3.11 Análises histológicas

Após o sacrifício, amostras de músculo estriado esquelético, fígado e tecido adiposo epididimal foram imersas em uma solução fixadora contendo 10% de formol, em tampão PBS 0,1 M pH 7,4 por 24 horas. Os tecidos foram desidratados através de banhos em uma série crescente de etanol (70%, 95% e 100%). Foram então diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica.

Os blocos de parafina foram cortados em um micrótomo (cortes de 5-8 µm de espessura) de modo a obter cortes das diversas regiões dos tecidos analisados. Os

cortes foram distendidos em banho-maria (40 °C) e colocados em lâminas de vidro cobertas com albumina de Meyer para fixação.

Uma vez montados nas lâminas, os cortes foram colocados numa estufa 55 °C por aproximadamente 4 horas, para melhor fixação e para retirar a parafina excedente. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas utilizando xilol, e hidratadas em uma série decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e posteriormente água, para que o corante pudesse penetrar no tecido. Então, os cortes foram corados com a coloração rotineira de H&E (hematoxilina-eosina), específico para subtâncias ácidas e básicas. Após a coloração, os cortes foram novamente desidratados, banhados em xilol e finalmente cobertos com lamínula de vidro utilizando bálsamo do Canadá. As análises e documentações do material foram realizadas em um microscópio BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japão).

3.12 Atividade mitocondrial

Para verificar a atividade mitocondrial, ensaios com succinato desidrogenase e citocromo oxidase foram realizados no músculo estriado esquelético. Primeiramente, os animais foram sacrificados e o músculo estriado esquelético (gastrocnêmio e sóleo) foi removido e rapidamente criopreservado, utilizando imersão em isopentano gelado em nitrogênio líquido por alguns segundos. Em seguida, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Iniciamente, as amostras de músculos foram fixadas em um suporte e cobertas com um pouco de OCT (*Optimal Cutting Temperature – Tisue-Tek*), e processadas em um criostato (cortes de 5-10 μM de espessura) de modo a obter cortes seriados de todo o músculo (gastrocnêmio e sóleo). Posteriormente, os cortes foram fixados em uma lâmina carregada positivamente para melhor fixação do tecido. Todos os experimentos de atividade mitocondrial foram realizados a fresco.

A histoquímica para succinato desidrogenase foi realizada pela incubação de cortes frescos dos músculos congelados, incubados em um substrato de succinato desidrogenase na presença de um composto tetrazólio. O resultado é um precipitado púrpura-azul depositado em locais de mitocôndrias em redes sarcoplasmáticas (fibras musculares tipo I são mais escuras que tipo II).

A citocromo oxidase faz parte da cadeia respiratória oxidativa de enzimas localizadas exclusivamente nas mitocôndrias. A utilização de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) resulta em um composto castanho insolúvel no local da atividade da citocromo oxidase, mostrando assim sítios de atividade mitocondrial.

Após as reações de hitoquímica as amostras finalmente foram cobertas com lamínula utilizando um meio de fixação aquoso (gliserol carbonato). As análises e documentações do material foram realizadas em um microscópio BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japão).

3.13 Pressão arterial

A pressão arterial e batimentos cardíacos foram determiandas como descrito anteriormente (CARDOSO et al., 2010). Os animais WT e KO foram anestesiados com isofluorano e um cateter modificado (tipo MRE-025, 0,025 diâmetro exterior, 0,012 diâmetro interior; Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) foi colocado na aorta abdominal através da artéria femoral para medição da pressão arterial. O cateter foi suturado subcutâneo entre as escápulas, e após um período de 72 horas de recuperação, a pressão arterial foi aferida utilizando um transdutor (modelo MLT 1050) ligado a um computador para aquisição e análises dos dados (PowerLab, AD Instruments, Colorado Springs, PA, EUA).

Para testar a resposta da pressão arterial a diferentes drogas, diferentes neuropeptideos foram injetados e a pressão arterial foi aferida como descrito anteriormente. Inicialmente, um segundo cateter modificado foi colocado na veia femural dos animais. Os animais ficaram em recuperação por um pedíodo de 72 horas. Após 1 hora de aferição da pressão arterial basal, neurotensina (1 nM/animal), angiotensina II (100 ng/animal) ou bradicinina (5 mg/kg e 10 mg/kg) foram injetadas e a pressão arterial aferida.

3.14 Extração de peptídeos

Inicialmente os animais foram sacrificados por decaptação e amostras de músculo estriado esquelético (gastrocnêmico e sóleo), fígado e tecido adiposo epididimal foram rapidamente coletados em água Milli-Q (4 ml) à 80 °C. As amostras foram então homogeneizadas por 30 segundos com o auxílio de *Polytron* (*Tissue*

Tearor, Bio Spec Products Inc., Bartlesville, OK, USA). Os homogenatos foram incubados por 20 minutos a 80 °C, posteriormente resfriados a 4 °C para acidificação das amostras com adição de HCl para uma concentração final de 10 mM, e submetidas a 40 minutos de centrifugação a 1500 x g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana Millipore que permitiu a passagem de moléculas com peso molecular inferior a 10 kDa (Centrifugal Filter Unit, MILLIPORE, 10,000 NMCO). O material não retido pela membrana (eluato, fração contendo moléculas < 10 kDa) foi aplicado em pré-colunas OASIS (Millipore, Billerica, MA, EUA), lavados com água Milli-Q, e eluídos com metanol 100% contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,15%. O volume do material foi reduzido ao mínimo (aproximadamente 5 µL) por centrifugação a vácuo (*Speed Vac*, Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e estocado a - 80 ºC até o momento de uso (Figura 6).

3.15 Quantificação de peptídeos

Os peptídeos extraídos de amostras de músculo, fígado e tecido adiposo epididimal, como descritos acima, foram resuspendidos em 65 µL de água Milli-Q e quantificados através de um método fluorimétrico utilizando o marcador fluorescamine ($C_{17}H_{10}O_4$), assim como descrito anteriormente (SARIC; GRAEF; GOLDBERG, 2004).

Neste método, as moléculas das aminas primárias presentes nos resíduos de lisina (K) e N-terminal dos peptídeos extraídos sofrem uma ligação pela molécula de fluorescamine. Uma vez reagindo com essas aminas primárias à molécula de fluorescamine emite fluorescência medida nos comprimentos de onda de 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão). As concentrações de peptídeos nas amostras foram determinadas através de uma curva padrão utilizando o peptídeo 5A (LTLRTKL) como padrão.

Os experimentos foram realizados em placa branca opaca de 96 poços (Corning Incorporated, NY, USA). Em cada poço misturamos 2,5 µL de amostra, 25 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6.8) e 12,5 µL de solução de fluorescamine 0,3 mg/mL diluída em acetona. Após a aplicação de todas as amostras, a placa foi incubada no agitador por 1 min, quando foi acrescentado 110 µL de água. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão).

3.16 Marcação isotópica de peptídeos

Após a dosagem de peptídeos, foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de sódio ($NaHPO_4$; 0,4 M) a 50 µg de peptídeos, em seguida o pH foi ajustado para 9,5 e foram adicionados 6,4 µL de uma solução de 350 µg/µL de D_0-trimetilamôniobutiril (TMAB), D_3-TMAB ou D_9-TMAB dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Após 8 minutos em temperatura ambiente, uma solução de NaOH 1M foi usada para ajustar o pH da reação para 9,5 (quando necessário), e novamente as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 8 minutos. A adição dos reagentes marcadores (D_0-TMAB, D_3-TMAB ou D_9-TMAB) e do NaOH foi repetida por mais 8 vezes, mantendo-se os mesmos intervalos de tempo entre uma adição e outra. Após o término da marcação, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e 30 µL de uma solução de glicina 2,5 M foram adicionados para interromper a reação de marcação isotópica. As amostras foram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente e agora marcadas com os devidos marcadores isotópicos (D_0-TMAB, D_3-TMAB ou D_9-TMAB), forão combinadas e centrifugadas a 600 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi então coletado e o pH ajustado para 9,0 com uma solução de NaOH 1M. Ainda, foi adicionado hidroxilamina 2 M (na proporção de 3 µL para cada 1 ml de amostra), para remover possíveis marcações em resíduos de tirosina. A adição de hidroxilamina e o ajuste do pH para 9,0 foram repetidos 3 vezes, respeitando um intervalo de tempo de 10 minutos entre estas repetições. Por fim, essas amostras foram dessalinizadas em colunas OASIS (Millipore, Billerica, MA, EUA) e os peptídeos marcados foram eluidos em 1 ml de metanol contendo 0,15% de TFA. Para remoção do metanol as amostras foram submetidas à centrifugação a vácuo e armazenadas a -80 °C (Figura 6).

Figura 5 – Marcadores TMAB utilizados para marcação isotópica.

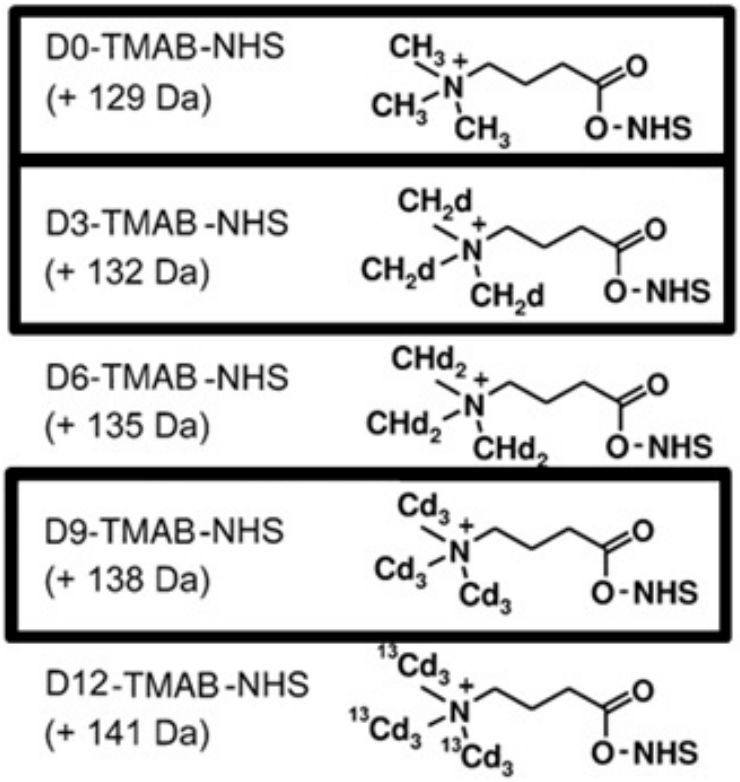

Figura 5: A figura mostra os 5 tipos de marcadores TMAB que podem ser utilizados para marcação isotópica de peptídeos na porção N-terminal e o lisinas. Em destaque, estão os marcadores utilizados em nossos experimentos. Mostrando as diferenças de 3 Da quando o peptídeo incorpora os marcadores D0-TMAB quando comparados com D3-TMAB, ou de 9 Da quando ocorre a incorporação dos marcadores D0-TMAB quando comparados com D9-TMAB.

3.17 Análises por LC-MS/MS

Para as análises semiquantitativas, as amostras de peptídeos marcados com D_0-TMAB, D_3-TMAB ou D_9-TMAB foram ressuspendidas em 15 µL de água Milli-Q e submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) em um aparelho *Synapt*® G2 (Waters, Manchester, UK), acoplado a um sistema de cromatografia líquida capilar *nanoACQUITY*, sistema *Ultra Performance* LC® (UPLC®, Waters, Manchester, UK). As misturas peptídicas marcadas foram separadas em gradiente de eluição, variando de 0-85% de uma mistura água/acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico, em coluna capilar de 75 µm empacotada com sílica C18. Os dados foram adquiridos automaticamente em modo dependente (DDA) após geração de múltiplos peptídeos protonados por ionização em *eletron spray* (ESI), seguido de dissociação em MS/MS por colisão

com argônio, em intensidade de 10 a 30 eV. Condições típicas de LC e ESI foram: fluxo de 10 nL/min, voltagem no capilar do nanofluxo de 3.5 kV, temperatura do bloco de 80 ^{o}C, e voltagem do cone de 100 V.

Figura 6 – Esquema representativo da extração de peptídeos intracelulares, marcação isotópica e análise LC-MS/MS.

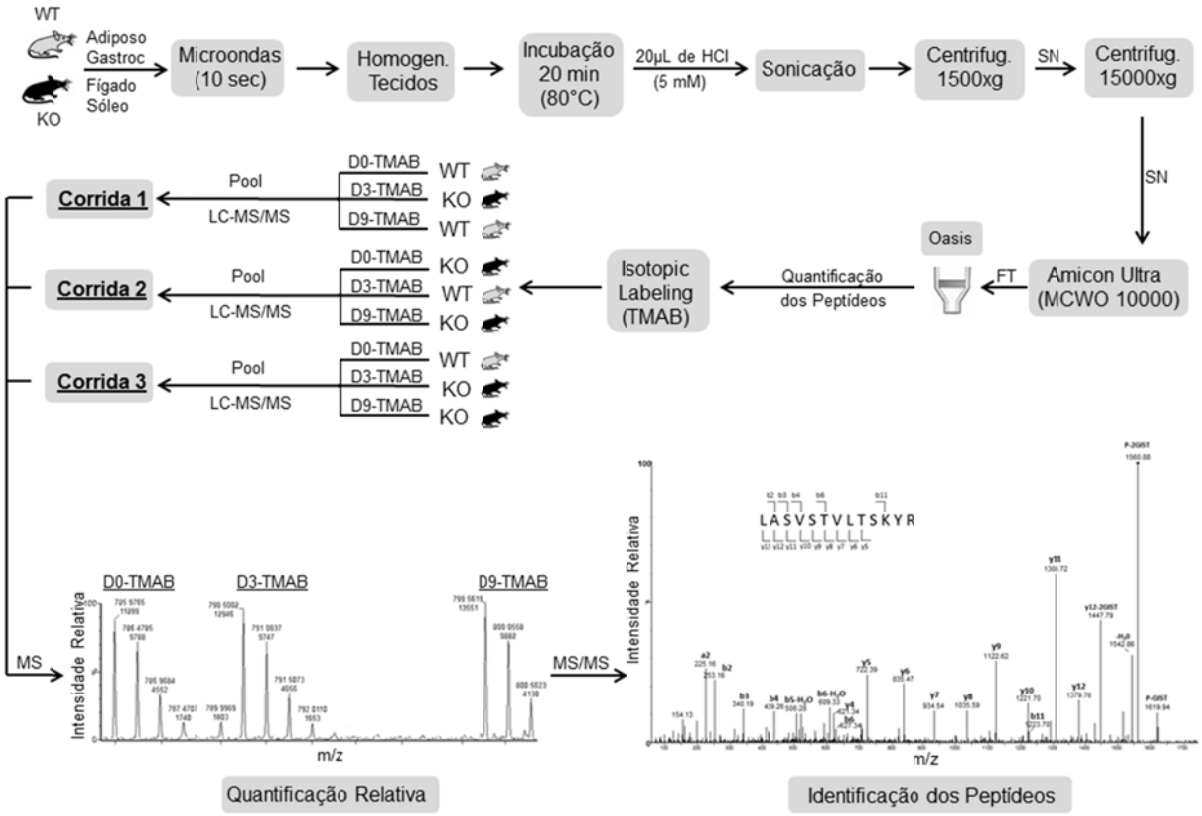

Figura 6: Inicialmente o esquema mostra brevemente o passo-a-passo do protocolo de extração de peptídeos intracelulares. Os peptídeos extraídos foram agrupados em 3 diferentes corridas (como demonstrado acima) de modo a comparar os animais WT com os KO, nos diferentes tecidos estudados (gastrocnêmio, sóleo, tecidos adiposo epididimal e fígado). Então, na corrida 1, os peptídeos dos animais WT foram marcados com D0-TMAB e D9-TMAB, enquanto que os peptídeos dos animals KO foram marcados com D3-TMAB. Na corrida 2 foi feito o inverso, e por fim, na corrida 3 os peptídeos dos animais WT foram marcados com D0-TMAB, enquanto os dos animais KO foram marcados com D3-TMAB e D9-TMAB. As corridas foram marcadas de diferentes maneiras para servir como controle da reatividade dos marcadores isotópicos. A quantificação relativa foi feita baseada na altura da média da intensidade relativa dos picos dos peptídeos dos animais KO em relação aos animais WT no MS. Os espectros de MS/MS foram analisados para identificação da sequência de aminoácidos dos peptídeos. Utilizamos o programa Mascot para identificação das sequências dos peptídeos, seguido de interpretação manual para eliminação de falsos positivos.

A incorporação de diferentes isótopos D_0-TMAB, D_3-TMAB ou D_9-TMAB aos resíduos de lisina ou N-terminal dos peptídeos, adiciona diferentes massas de acordo com o marcador isotópico (128,118 Da para D_0-TMAB, 131,133 Da para D_3-

TMAB e 137,170 Da para D_9-TMAB), resultando em uma diferença na razão massa/carga (m/z), as quais podem ser visualizadas durante a detecção do primeiro MS, que consiste na massa do peptídeo não fragmentado. Uma vez determinado, a massa do peptídeo, o mesmo é fragmentado em uma câmera de colisão com argônio gerando o MS/MS, a partir de onde ocorre a identificação da sequência de aminoácidos.

Após a extração, quantificação, marcação isotópica e semi-quantificação por LC-MS, as sequências dos peptídeos obtidas por MS/MS, foram analisadas para identificação das sequências de aminoácidos dos peptídeos identificados no LC-MS e de suas proteínas precursoras.

Embora a análise manual do MS/MS seja possível, esta análise é normalmente realizada usando programas para pesquisas em bancos de dados de proteínas, a partir de dados de MS/MS. Vários programas estão disponíveis para esse tipo de análise, no entanto o Mascot (http://www.matrixscience.com) é ideal para análise de peptídeos marcados com TMAB (marcador isotópico que foram utilizados nos nossos experimentos). Dessa forma, a análise de sequenciamento dos peptídeos foi realizada através do programa Mascot versão 2.2 (Matrix Science Ltd, UK).

Inicialmente, foi realizada a submissão dos dados para o Mascot, utilizando o banco de dados Swiss-Prot com a taxonômia *Mus musculus,* sem digestão enzimática. A tolerância do erro utilizada para os íons precursores de MS e MS/MS foi de 0,2 Da. Após a obtenção dos resultados, as sequências peptídicas foram validadas por interpretação manual para a eliminação dos resultados falsos positivos. Nessas análises, foram levados em consideração diversos fatores já descritos anteriormente (GELMAN et al., 2012; LYONS; FRICKER, 2011), como: o número de *tags* incorporados no peptídeo que deve corresponder ao número de lisinas e N-terminal presentes; *score* das possibilidades de sequência dos peptídeos apresentados pelo Mascot; a maioria dos fragmentos mais intensos de MS/MS (>80%) devem ser íons *a*, *b* ou *y*, ou o íon precursor com perda de parte do marcador; um mínimo de 5 fragmentos de íons *b* ou *y* devem ser encontrados; o número de cargas deve ser consistente com o do peptídeo.

3.18 Ensaio de hidrólise dos peptídeos identificados como possíveis substratos da Nln

Com o intuito de determinar se os peptídeos identificados no tecido adiposo epididimal e gastrocnêmio eram substratos da Nln, realizamos as reações de cinéticas (ordem zero) a 37 °C. Para estas reações, uma solução de 50 µM de cada peptídeo foi incubado na presença de 230 nM da Nln recombinante, em um volume final de 1800 µL de tampão TBS.

Para determinar o percentual de hidrólise dos peptídeos, 250 µL de cada reação foi retirada nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min. Estas alíquotas foram transferidas para novos tubos contendo 12,5 µL de uma solução TFA 10% em H_2O, para encerrar a reação. Posteriormente, 50 µL de cada amostra foram utilizados para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detecção dos picos cromatográficos e cálculo do percentual de hidrólise de cada peptídeo em relação à área dos seus respectivos picos cromatográficos no tempo 0 min. Como controle positivo foi utilizado à bradicinina, que é um ótimo substrato da Nln, nas mesmas condições experimentais (RIOLI et al., 1998).

3.19 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos ± SEM. As análises estatísticas foram conduzidas por teste T não pareado para amostras independentes, ou ANOVA seguido de teste Bonferroni para amostras comparando 2 ou mais grupos. Valores de p considerados significantes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ or *** $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Geração de camundongos *knockout* para Nln

Os camundongos deficientes em Nln foram gerados por deleção da sequência codificadora entre os *exons* 1 e 2, conforme descrito nos materiais e métodos (Figura 3). Inicialmente, foi realizada a genotipagem dos animais para identificação ou não do inserto *Gene Trap*. Assim, foi realizada a seleção dos animais WT, KO ou heterozigotos que seriam utilizados nos experimentos seguintes (Figura 7).

Figura 7 – Padrão de bandas após a genotipagem para identificação do inserto *Gene Trap* dos camundongos *knockout* para Nln.

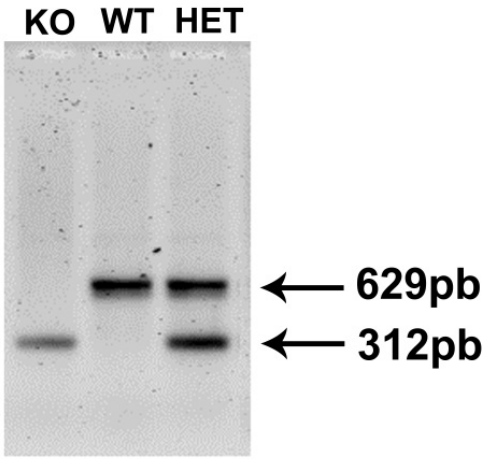

Figura 7: Imagem da PCR após a genotipagem para identificação dos animais KO, WT e heterozigotos (HET). A banda com 312 pares de base é específica para os animais KO, enquanto a banda com 629 pares de base é específica para os animais WT. A presença das duas bandas representa os animais HET.

Após a genotipagem (Figura 7), para confirmação da ausência da expressão do mRNA da Nln, foram realizados ensaios de qPCR (Figura 8A). Para checagem da expressão da proteína que correspondia Nln, foram realizados ensaios de *Western blotting* (Figura 8B). Ensaios de atividade enzimática da Nln foram realizados afim de confirmar a presença ou ausência da atividade da Nln (Figura 8C).

Figura 8 – Ensaios de qPCR, *Western blotting* e atividade enzimática para confirmação dos animais *knockout* para Nln.

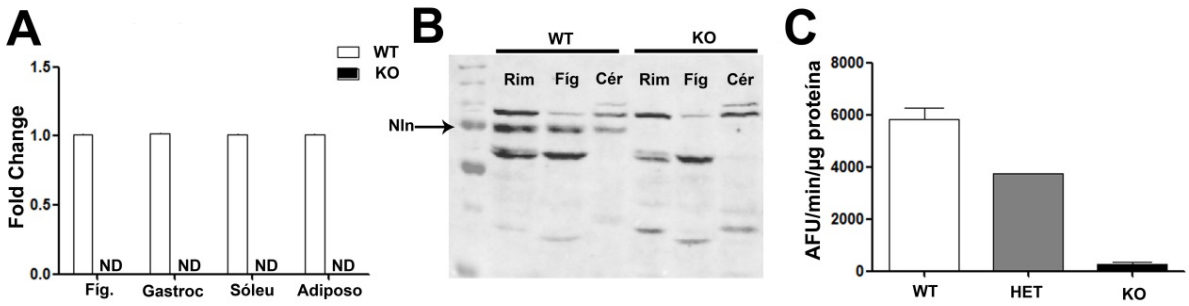

Figura 8A: qPCR mostrando ausência da expressão do gene Nln (ND – não detectado) em animais KO em diferentes tecidos quando comparados com animais WT. **Figura 8B:** *Western blotting* para identificação da expressão protéica da Nln (seta) mostrando a ausência ou não da expressão protéica da Nln em diferentes tecidos de animais WT e KO. **Figura 8C:** Teste de atividade enzimática confirmando os resultados obtidos na genotipagem, qPCR e *Western blotting* mostrando a redução em aproximadamente 50% da atividade enzimática da Nln nos animais heterozigotos (HET) e ausência total da atividade da enzima em animais KO.

4.2 Características básicas de camundongos *knockout* para Nln

Os resultados obtidos depois do intercruzamento de animais heterozigotos (+/-) para obtenção de animais KO (-/-) e WT (+/+) mostraram que a deleção do gene da Nln não resultou em morte embrionária, bem como não houve nenhuma alteração na distribuição Mendeliana da prole. Além disto, animais KO não são visualmente distinguíveis dos WT, apresentando uma aparência externa normal e nenhum problema relacionado com fertilidade (os animais se reproduzem normalmente). Contudo, mesmo não apresentando nenhuma diferença na análise desintométrica da composição corporal (massa muscular, massa gorda e água total) dos animais KO quando comparados com WT (Figura 9A, B e C), os animais KO mostraram uma leve, porém significante, diminuição do peso corporal quando comparados com os animais WT (Figura 9D). Além disso, mesmo com essa pequena mudança, nenhuma diferença foi encontrada nos pesos relativos de diferentes órgãos dos animais KO quando comparados com animais WT (Tabela 1).

Figura 9 – Análise densitométrica da composição corporal e da massa corporal.

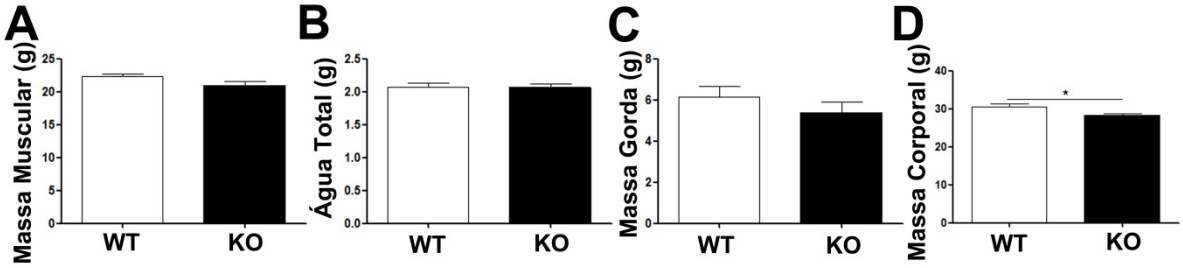

Figura 9A, B e **C:** Análise densitométrica da composição corporal de massa muscular (A), água total (B) e massa gorda (C) de animais KO quando comparados com animais WT. **Figura 7D:** massa corporal total de animais KO quando comparados com animais WT (n=6). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's: * $p < 0.05$.

Tabela 1 – Peso relativo de diferentes órgãos.

	WT				KO			
	Média		**S.E.M**	**n**	**Média**		**S.E.M**	**n**
Gastrocnêmio	5.21	±	0.49	6	5.20	±	0.19	6
Tibial Anterior	1.77	±	0.13	6	2.02	±	0.22	6
Sóleo	0.39	±	0.03	6	0.36	±	0.01	6
Fígado	49.04	±	3.80	6	45.77	±	4.00	6
Adiposo Epididimal	21.81	±	4.78	6	16.80	±	6.65	6
Baço	5.74	±	1.27	6	5.04	±	1.09	6
Rim	13.17	±	1.09	6	12.72	±	0.42	6
Cérebro	15.08	±	1.22	6	16.27	±	0.63	6
Coração	5.12	±	0.46	6	5.17	±	0.38	6
Pulmão	7.61	±	1.63	6	6.08	±	0.84	6

Nota de Rodapé: Todos as medidas são apresentadas como mg de tecido/g de peso corporal do animal vivo.

4.3 Testes de tolerância à glicose, insulina e piruvato

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado em animais KO comparados com animais WT, submetidos a um jejum de 12 horas, para investigar se a sensibilidade à glicose dos KO estava alterada. Iniciamente, foi verificado os níveis sanguíneos de glicose basal; contudo, a glicemia basal não apresentou nenhuma diferença entre os animais (Figura 10A). No teste de tolerância à glicose, após a injeção intraperitoneal de glicose, a glicemia foi significativamente menor em animais KO, quando comparados com animais WT, nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos (Figura 10B). Sendo assim, os animais KO se mostraram mais tolerantes à glicose quando comparados com animais WT (Figura 10B e C).

Figura 10 – Teste de tolerância à glicose (GTT).

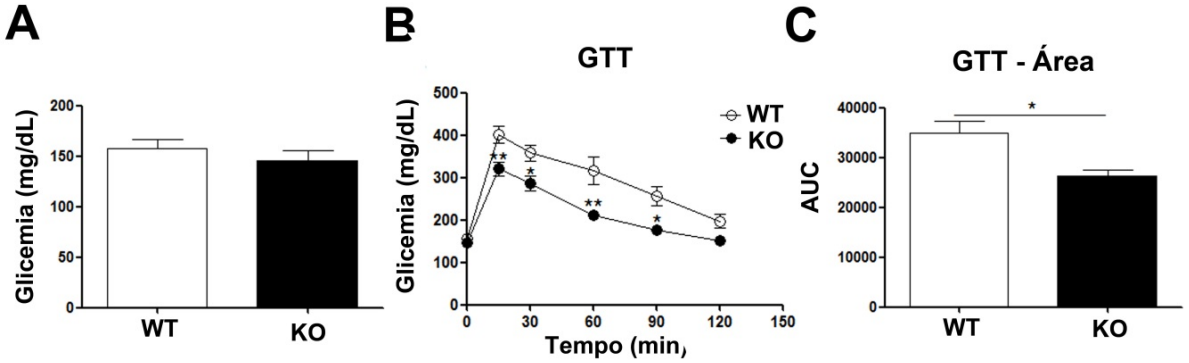

Figura 10A: Níveis de glicose basal após jejum de 12 horas (n=6). **Figura 10B:** Teste de tolerância à glicose (GTT) após injeção intraperitoneal de glicose em animais submetidos a jejum de 12 horas (n=6). **Figura 10C:** Área sob a curva (AUE) referente ao teste de tolerância à glicose (GTT) (n=6). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's ou ANOVA, seguido de teste Bonferroni:. * $p < 0.05$ ou ** $p < 0.01$.

Para melhor caracterizar o perfil metabólico desses animais, e uma vez que os animais KO são mais tolerantes a glicose, foi realizado teste de tolerância à insulina (ITT). Considerando os dados da curva de ITT (Figura 11A), bem como da constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) (Figura 11B), calculados a partir do teste de tolerância à insulina, os animais KO apresentaram um aumento na sensibilidade à insulina, quando comparados aos animais WT (Figura 11).

Figura 11 – Teste de tolerância à insulina (ITT).

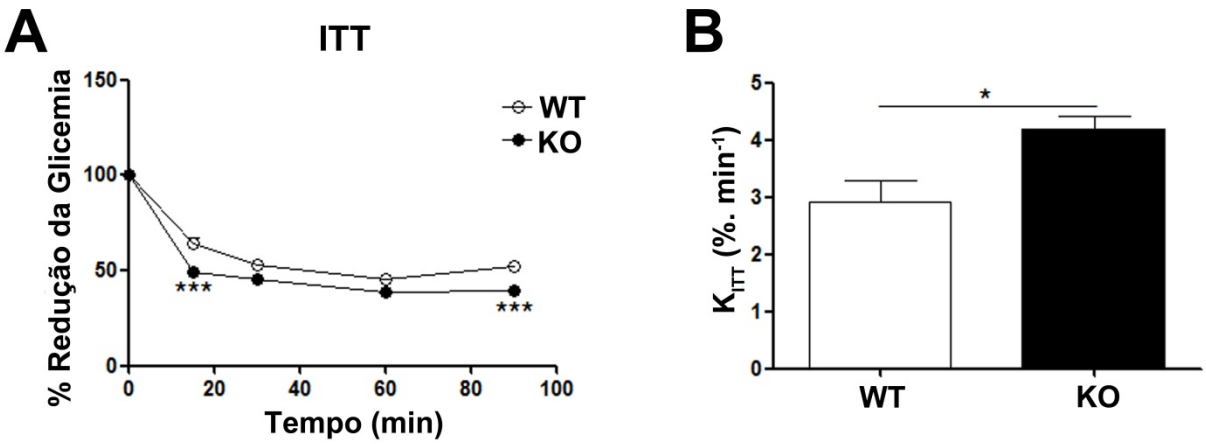

Figura 11A: Teste de tolerância à insulina (ITT) após injeção intraperitoneal de insulina em animais submetidos a jejum de 12 horas (n=6). **Figura 11B:** Cálculo da constante de decaimento de glicose baseado nos dados da curva do teste de tolerância a insulina (ITT). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's ou ANOVA seguido de teste Bonferroni:. * $p < 0.05$ ou *** $p < 0.001$.

Além do teste de tolerância à glicose e a insulina, o teste de tolerância a piruvato foi realizado com a finalidade de estimar a capacidade de gliconeogênese hepática em animais submetidos a um jejum de 16 horas. O piruvato foi utilizado porque é o metabólico intermediário comum nas diversas vias gliconeogênicas. O piruvato pode ser formado tanto a partir do lactato como também de aminoácidos ou glicerol. Os resultados obtidos mostraram que os animais KO apresentaram uma maior produção de glicose a partir de piruvato, quando comparados com animais WT, apresentando uma maior área sob a curva (Figura 12A e B).

Figura 12 – Teste de tolerância à piruvato (gliconeogênese).

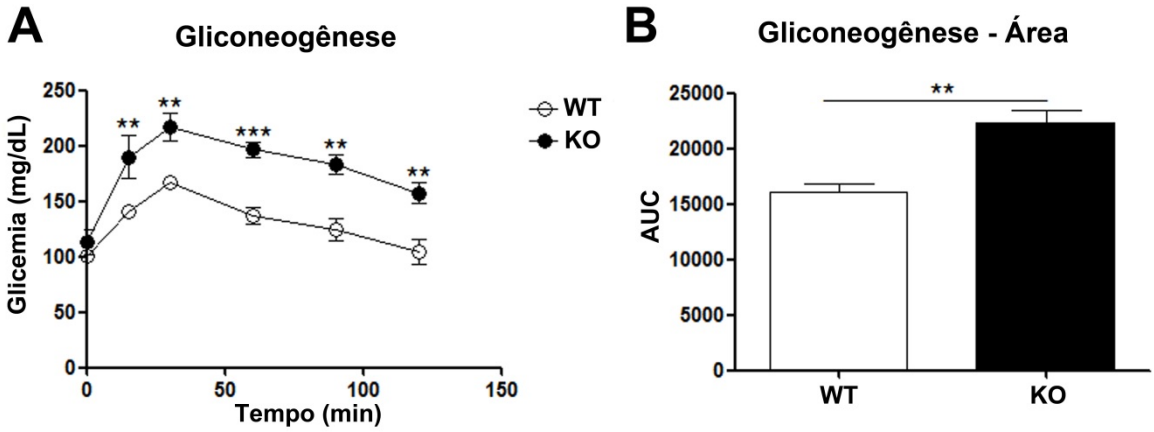

Figura 12A: Teste de tolerância à piruvato para verificar os níveis de gliconeogênese hepática após injeção intraperitoneal de piruvato em animais submetidos a jejum de 16 horas (n=6). **Figura 12B:** Área sob a curva referente ao teste de tolerância à piruvato. Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's ou ANOVA, seguido de teste Bonferroni:. ** $p < 0.01$ ou *** $p < 0.001$.

Após esses resultados, utilizando qPCR, foram testados vários genes que participam da gliconeogênese no fígado. Genes como frutose 6-bifosfatase (Fbp1) e glicokinase (Gck), que participam diretamente do processo de gliconeogênese no fígado, nos animais KO apresentaram uma superexpressão, assim como outros, em relação aos animais WT (Figura 13). Esses dados corroboram os dados *in vivo* dos testes de tolerância a piruvato.

Figura 13 – qPCR para expressão de genes envolvidos na gliconeogênese.

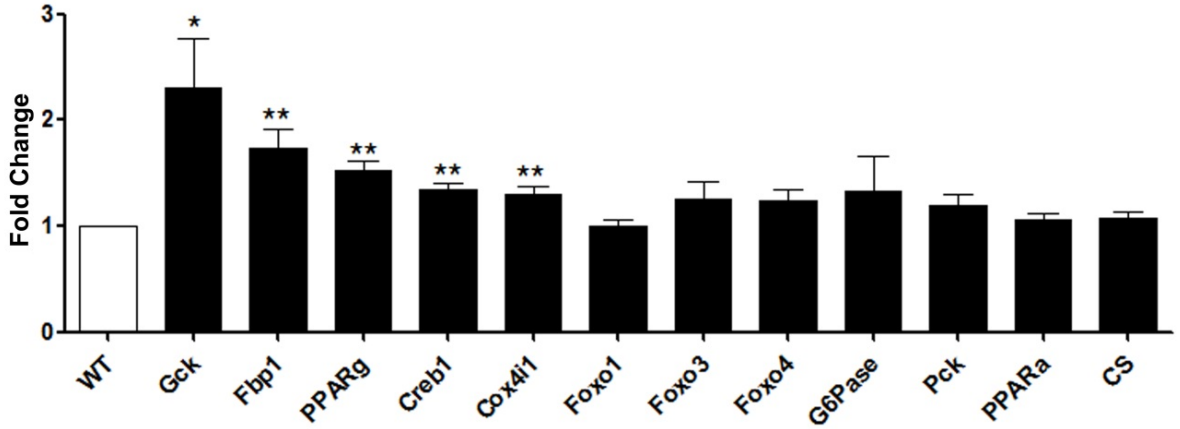

Figura 13: qPCR dos principais genes envolvidos na via de sinalização da gliconeogênese no fígado de animais submetidos a jejum de 16 horas (n=6). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's:. * $p < 0.05$ ou ** $p < 0.01$.

4.4 Sinalização da glicose – *Western blotting*

Para investigar as bases moleculares envolvidas com a maior sensibilidade à insulina dos animais KO, foram analisados os níveis de pAKT (Ser473) no gastrocnêmio, fígado e tecido adiposo epididimal, após estímulo com insulina. Embora os níveis basais de pAKT normalizados por AKT total nos animais KO e WT foram os mesmos em todos os tecidos analisados (Figura 14A, B e C), a fosforização de AKT em animais KO após estímulo com insulina, estava aumentada no gastrocnêmio (Figura 14A) e no tecido adiposo (Figura 14B) dos animais KO quando comparados com animais WT. No fígado não foram observadas diferenças entre os grupos KO e WT (Figura 14C). Considerando que a fosforilação da AKT é um ponto chave na via de sinalização da insulina, e que a fosforilação desta mostrou-se aumentada no músculo e tecido adiposo dos animais KO, os dados obtidos nos experimentos de fosforilação de AKT corroboram os resultados obtidos dos testes tolerância à insulina (Figura 11).

Figura 14 – *Western blotting* para fosforilação de AKT.

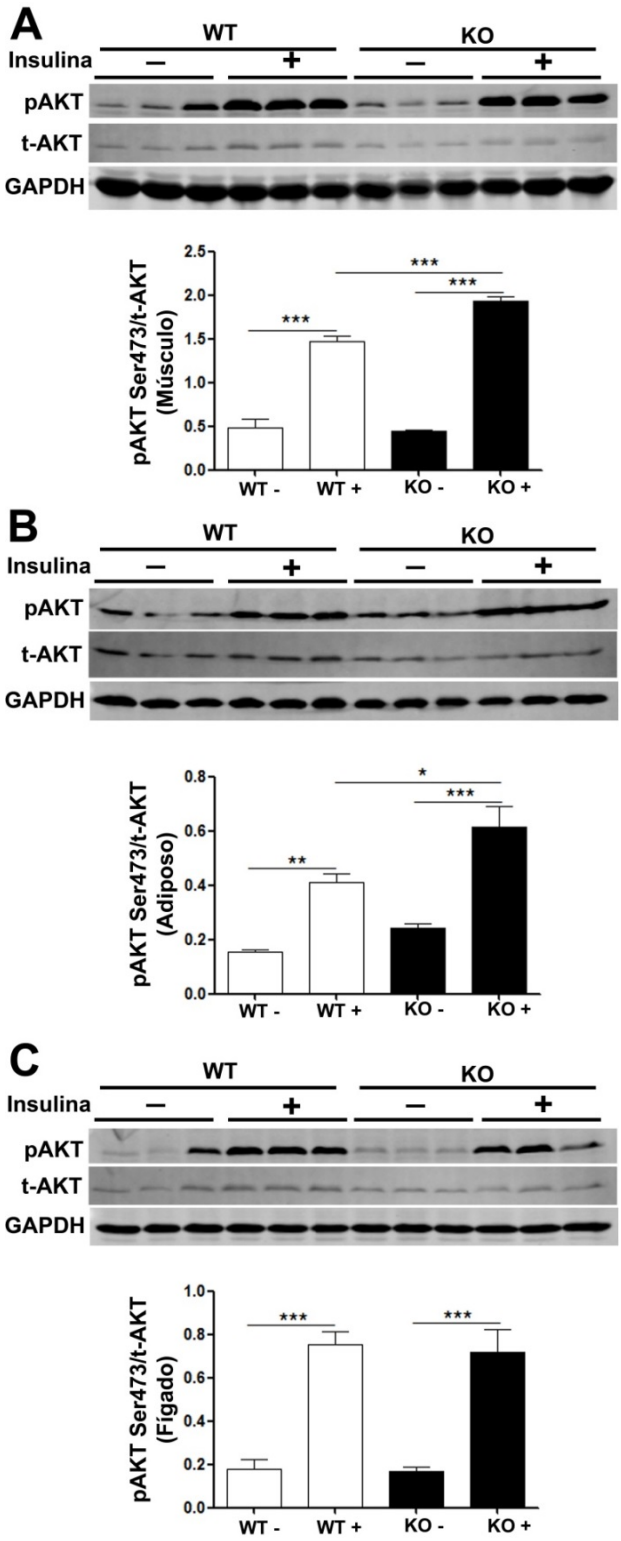

Figura 14: *Western blotting* mostrando fosforilação de AKT após estímulos (+) ou não (-) com injeção intravenosa de insulina em animais submetidos a jejum de 12 horas normalizados por AKT total e GAPDH (n=5). Os níveis de fosforilação de AKT em cada tecido foram representados pela razão pAKT(Ser473)/t-AKT. **Figura 14A:** Músculo estriado esquelético (gastrocnémio). **Figura 14B:** Tecido adiposo epididimal. **Figura 14C:** Fígado. Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste ANOVA seguido de teste Bonferroni:. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ou *** $p < 0.001$.

4.5 Testes de atividade enzimática da Nln em diferentes tecidos

A atividade enzimática da Nln em animais WT foi semelhante no músculo estriado esquelético sóleo e tecido adiposo epididimal. No fígado ela estava um pouco reduzida quando comparadas com os outros tecidos analisados. Contudo, a atividade enzimática da Nln no músculo estriado esquelético gastrocnémio estava aproximadamente três vezes menor quando comparadas com músculo estriado esquelético sóleo ou tecido adiposo epididimal, e aproximadamente duas vezes menor quando comparada com o fígado (Figura 15).

Figura 15 – Ensaio de atividade enzimática da Nln em diferentes tecidos.

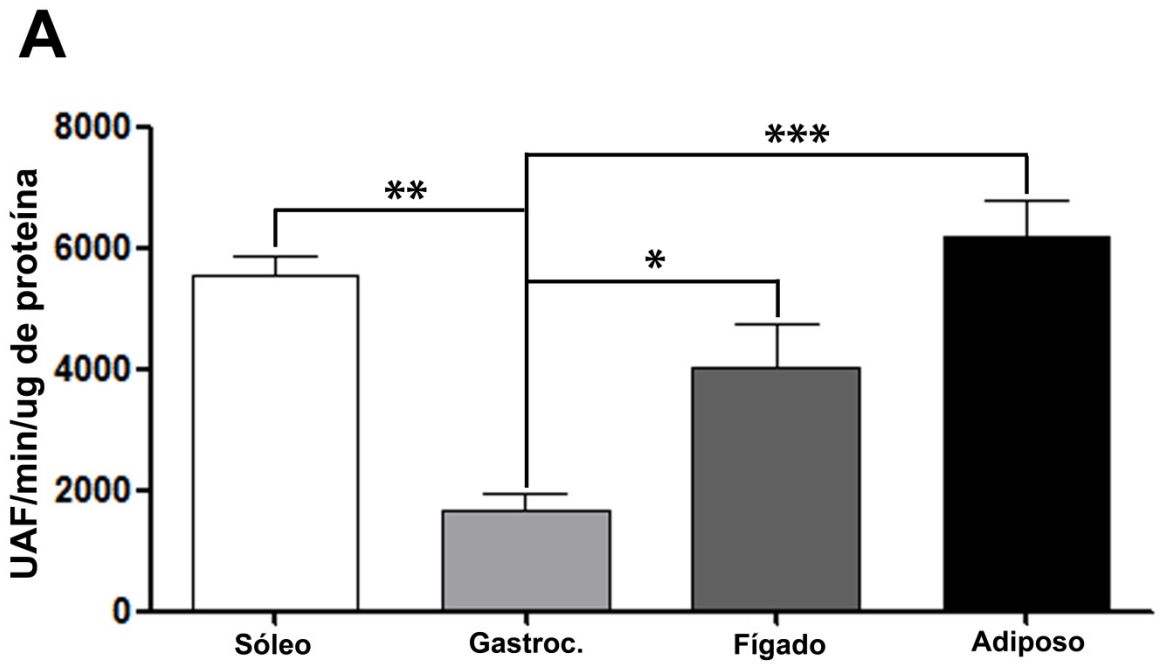

Figura 15: Atividade enzimática da Nln no sóleo (predomínio de fibras tipo I), gastrocnêmio (predomínio de fibras tipo II), fígado e tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6 (n=3). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste ANOVA seguido de teste Bonferroni:. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ou *** $p < 0.001$.

4.6 Testes de esforço progressivo em esteira

O músculo sóleo é rico em fibras tipo I, enquanto o gastrocnêmio é rico em fibras do tipo II. Fibras tipo I (oxidativas e de contração lenta) são necessárias para suporte e resistência e fibras tipo II (glicolíticas e de contração rápida) são mais

frequentemente usadas quando o organismo exerce movimentos que requer força e velocidade (FLYNN et al., 2010). Sendo assim, considerando os resultados obtidos nos testes de atividade enzimática da Nln em animais WT, foram realizados testes de corridas de alta (mais relacionado com fibras tipo II) e baixa (mais relacionado com fibras tipo I) intensidade em uma esteira graduada, para verificar o desempenho desses animais diante do exercício físico.

Primeiramente, foi realizado o teste de alta intensidade onde, após um breve aquecimento dos animais, a velocidade foi aumentada em 3 m/minuto a cada três minutos até a exaustão. Contudo, não houve diferença na distância percorrida e no tempo de corrida entre animais KO e WT (Figura 16A e B).

No teste de baixa intensidade, os animais KO correram aproximadamente uma distância 36% menor quando comparado com os WT (em média, os animais KO correram apenas 637 metros enquanto que os animais WT correram em média 997 metros; Figura 16C e D). Nesse teste, foi utilizado 70% do valor da média da velocidade máxima pecorrida pelos animais no teste de alta intensidade (aproximadamente 21 m/min), e os animais foram colocados para correr nessa velocidade constante até a exaustão.

Figura 16 – Testes de corrida de alta e baixa resistência física.

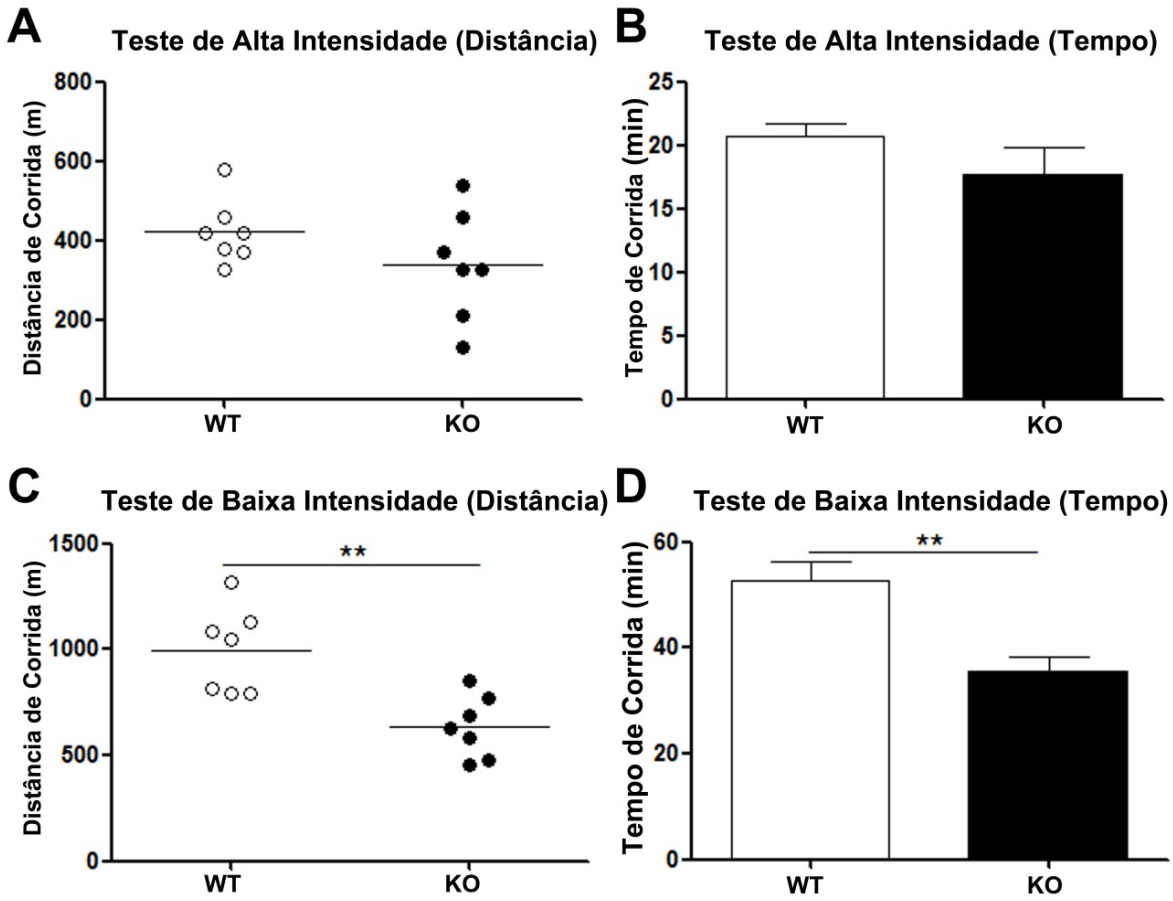

Figura 16A: Teste de corrida de alta intensidade com desempenho individual e média da distância pecorrida pelo grupo (n=7). **Figura 16B:** Média do tempo de corrida do teste de alta intensidade (n=7). **Figura 16C:** Teste de corrida de baixa intensidade com desempenho individual e média da distância pecorrida pelo grupo (n=7). **Figura 16D:** Média do tempo de corrida do teste de alta intensidade (n=7). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's:. ** $p < 0.01$.

4.7 Composição de fibras musculares analisadas por qPCR

Diante dos resultados obtidos nos ensaios de atividade enzimática e de esforço progressivo em esteira, verificamos a expressão de alguns genes para avaliar o perfil da composição das diferentes fibras musculares, em diferentes músculos estriados esqueléticos (gastrocnêmio e sóleo).

Os animais KO apresentaram uma diminuição na expressão de genes característicos de fibras lentas (fibras tipo I) no músculo gastrocnêmio (Figura 17A), mas não apresentaram nenhuma diferença no músculo sóleo (Figura 17C). Além disso, para melhor caracterizar o perfil de distribuição de fibras musculares, qPCR

específico para cada tipo de cadeia pesada de miosina (fibras musculares do tipo I, Myh7; fibras musculares do tipo IIa, Myh2; fibras musculares do tipo IIx, Myh1 e fibras musculares do tipo IIb, Myh4) foi realizado (Figura 17B e D). Essas análises confirmaram os dados anteriores sugerindo que no músculo gastrocnêmio dos animais KO ocorre um remodelamento de fibras musculares resultando numa diminuição da expressão do gene Myh7, específico de fibras musculares do tipo I (Figura 17B); Enquanto isso, no músculo sóleo não há nenhuma alteração significativa na expressão desses genes (Figura 17D).

Figura 17 – Análise da composição de fibras musculares no músculo estriado esquelético.

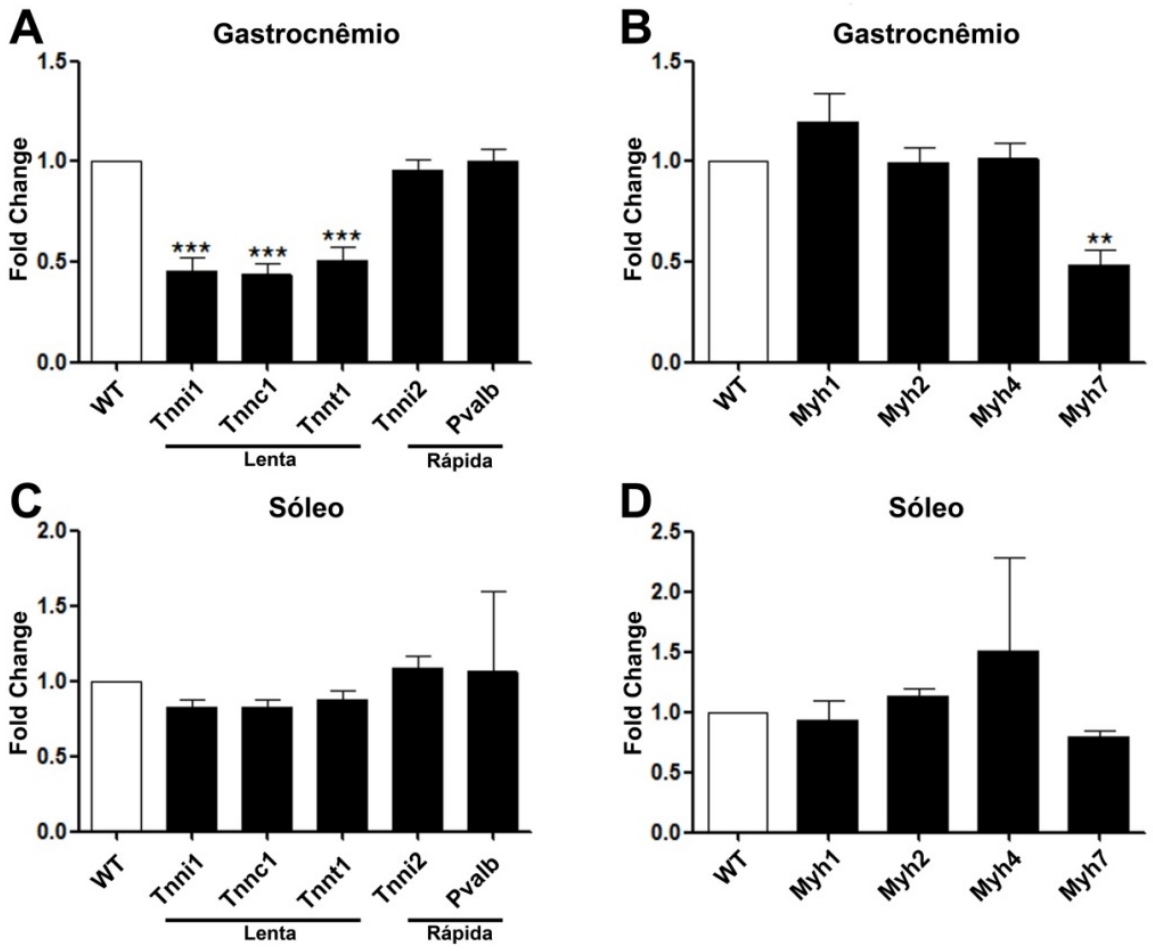

Figura 17A e **C:** qPCR mostrando genes específicos de fibras musculares do tipo I (fibras lentas) e fibras musculares do tipo II (fibras rápidas), em diferentes músculos estriados esqueléticos (n=6). **Figura 17B** e **D:** qPCR mostrando a subdivisão das fibras musculares em fibras do tipo I (Myh7), fibras do tipo IIa (Myh2), fibras do tipo IIx (Myh1) e fibras do tipo IIb (Myh4), em diferentes músculos estriados esquelético (n=6). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's:. ** $p < 0.01$ ou *** $p < 0.001$.

4.8 Atividade mitocondrial

Após resultados da composição de fibras musculares, cortes histológicos de músculos (gastrocnêmio e sóleo) foram submetidos a uma reação histoquímica para medida da atividade mitocondrial, com o objetivo de confirmar ou não a diminuição da quantidade de fibras do tipo I ricas em mitocôndrias. Para isso, ensaios de histoquímica em cortes frescos do músculo gastrocnêmio foram usados para avaliar a atividade das enzimas succinato desidrogenase e citocromo oxidase (Figura 18). O músculo gastrocnêmio apresentou uma diminuição nos sítios de atividade mitocondrial dos animais KO quando comparados aos animais WT, nos dois testes realizados (Figura 18). Esses dados corroboram a sugestão de diminuição da composição de fibras musculares do tipo I no gastrocnêmio dos animais KO em relação aos animais WT.

Figura 18 – Atividade mitocondrial do músculo gastrocnêmio.

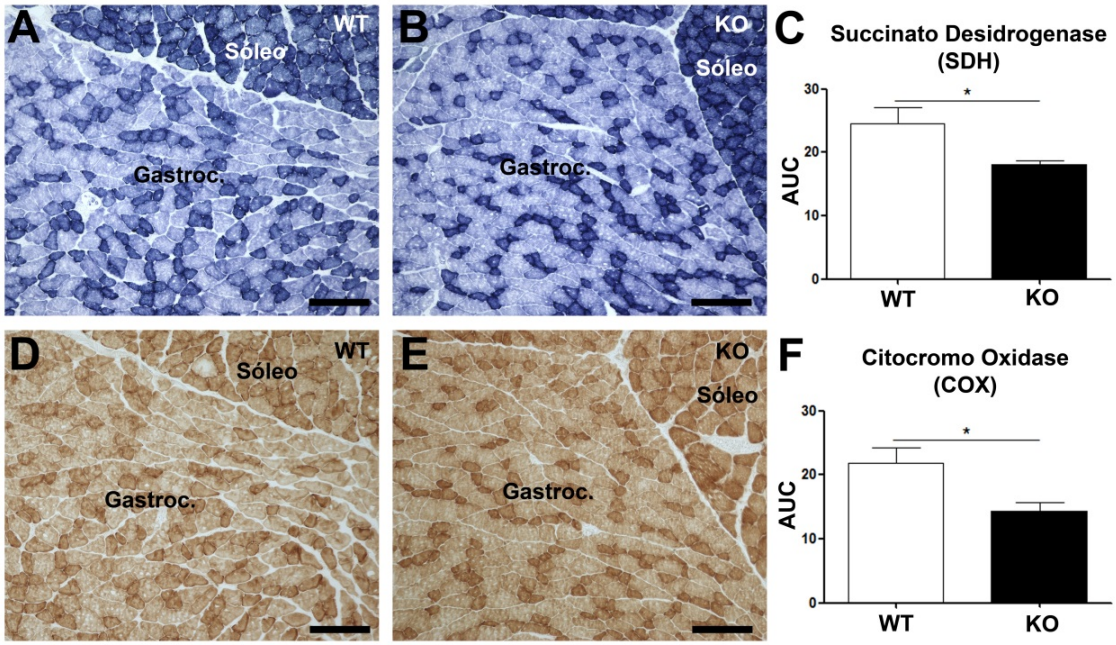

Figura 18A e **B:** Cortes histológicos de músculo mostrando histoquímica para succinato desidrogenase. **Figura 16C:** Quantificação da histoquímica de succinato deshidrogenase através do cálculo da área de quantidades de fibras do tipo I com maior atividade mitocondrial (coloração mais forte) em relação às fibras do tipo II com menor atividade mitocondrial (coloração mais fraca), os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (n=4). **Figura 18D** e **E:** Cortes histológicos de músculo mostrando histoquímica para citocromo oxidase. **Figura 18F:** Quantificação da histoquímica de succinato desidrogenase, através do cálculo da área de quantidades de fibras do tipo I com maior atividade mitocondrial (coloração mais forte) em relação às fibras do tipo II com menor atividade mitocondrial (coloração mais fraca). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (n=4). Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste não pareado de t Student's:. * $p < 0.05$.

4.9 Análises histológicas

Embora apresentando mudanças em diversos parâmetros (peso corporal, tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, gliconeogênese, exercício físico e composição de fibras musculares), nenhuma alteração histológica foi encontrada em biópsias coradas com hematoxilina e eosina (H&E) de fígado, músculo estriado esquelético e tecido adiposo epididimal dos animais KO, quando comparados com os animais WT (Figura 19).

Figura 19 – Análise histológica de diferentes tecidos corados com H&E.

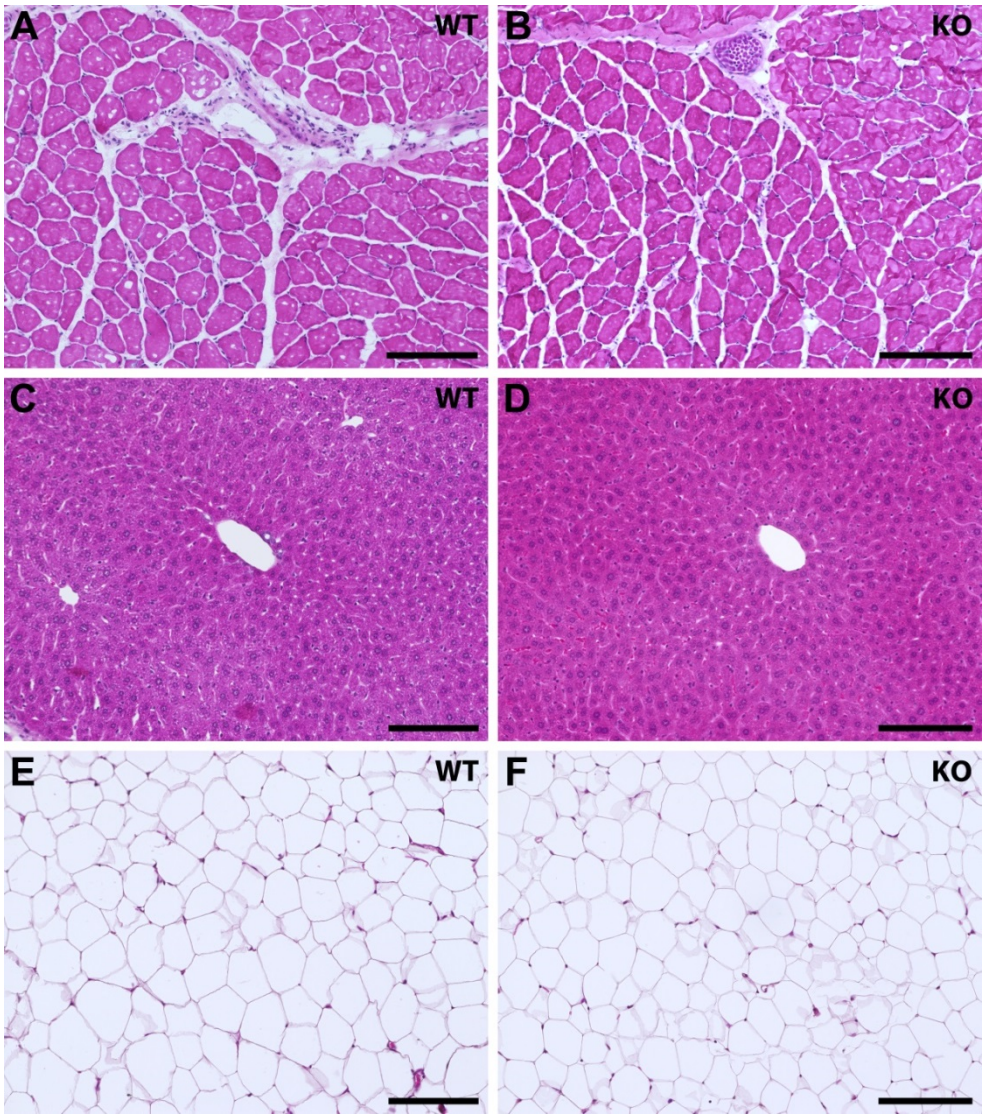

Figura 19A e **B:** Cortes histológicos de músculo (gastrocnêmio) corados com hematoxilina e eosina (H&E) de animais WT e KO, respectivamente. **Figura 19C** e **D:** Cortes histológicos de fígado corados com H&E de animais WT e KO, respectivamente. **Figura19E** e **F:** Cortes histológicos de tecido adiposo epididimal corados com H&E de animais WT e KO, respectivamente. Barra representa 200µm.

4.10 Caracterização fenotípica dos animais KO relacionadas ao sistema cardiovascular

Diante da existência de diversos trabalhos apontando uma possível relevância da Nln na homeostase cardiovascular (NORMAN et al., 2003; PILIPONSKY et al., 2008; SHRIMPTON; SMITH; LEW, 2002), investigamos os possíveis efeitos da deficiência da Nln na pressão arterial.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram mensuradas via cateter na artéria femoral. Em condições basais, não houve diferença entre animais KO quando comparados com os animais WT (Figura 20A e B).

Figura 20 – Pressão arterial e frequência cardíaca.

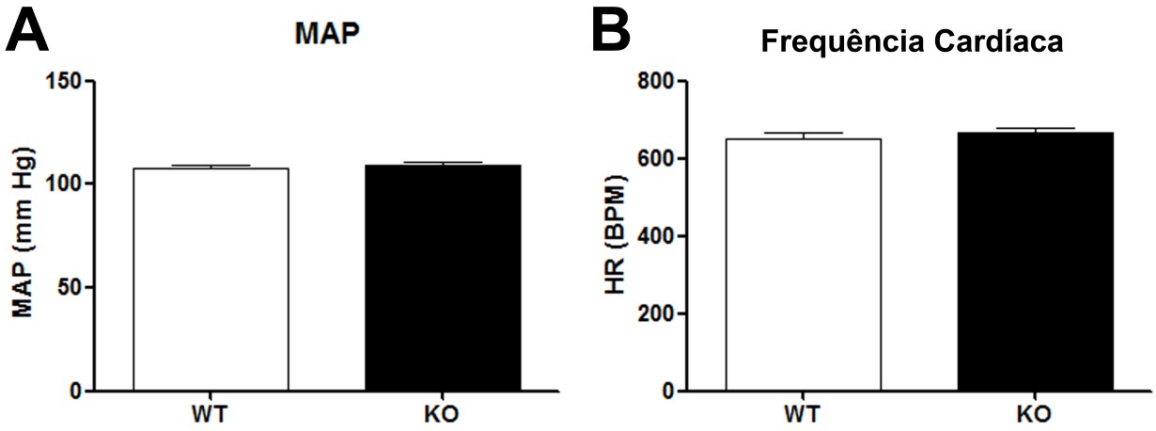

Figura 20A: Pressão arterial (MAP) de animais KO comparados com animais WT em condições basais (n=6). **Figura 20B:** Frequência cardíaca (HR) em batimentos por minuto (BPM) de animais KO comparados com animais WT em condições basais (n=6).

Além disso, embora não tenha sido encontrada nenhuma alteração na pressão arterial e frequência cardíaca dos animais KO quando comparados com os animais WT em níveis basais, foi administrado via um segundo cateter inserido na veia femoral, diferentes doses de bradicinina (Figura 21A), neurotensina (Figura 21B) ou angiotensina II (Figura 21C) para verificar os possíveis efeitos da administração aguda desses neuropeptídeos na pressão arterial dos animais KO quando comparados com animais WT. Contudo, mesmo após administração intravenosa desses neuropeptídeos, nenhuma diferença na pressão arterial foi encontrada comparando-se esses animais.

Figura 21 – Pressão arterial após administração aguda de diferentes neuropeptídeos.

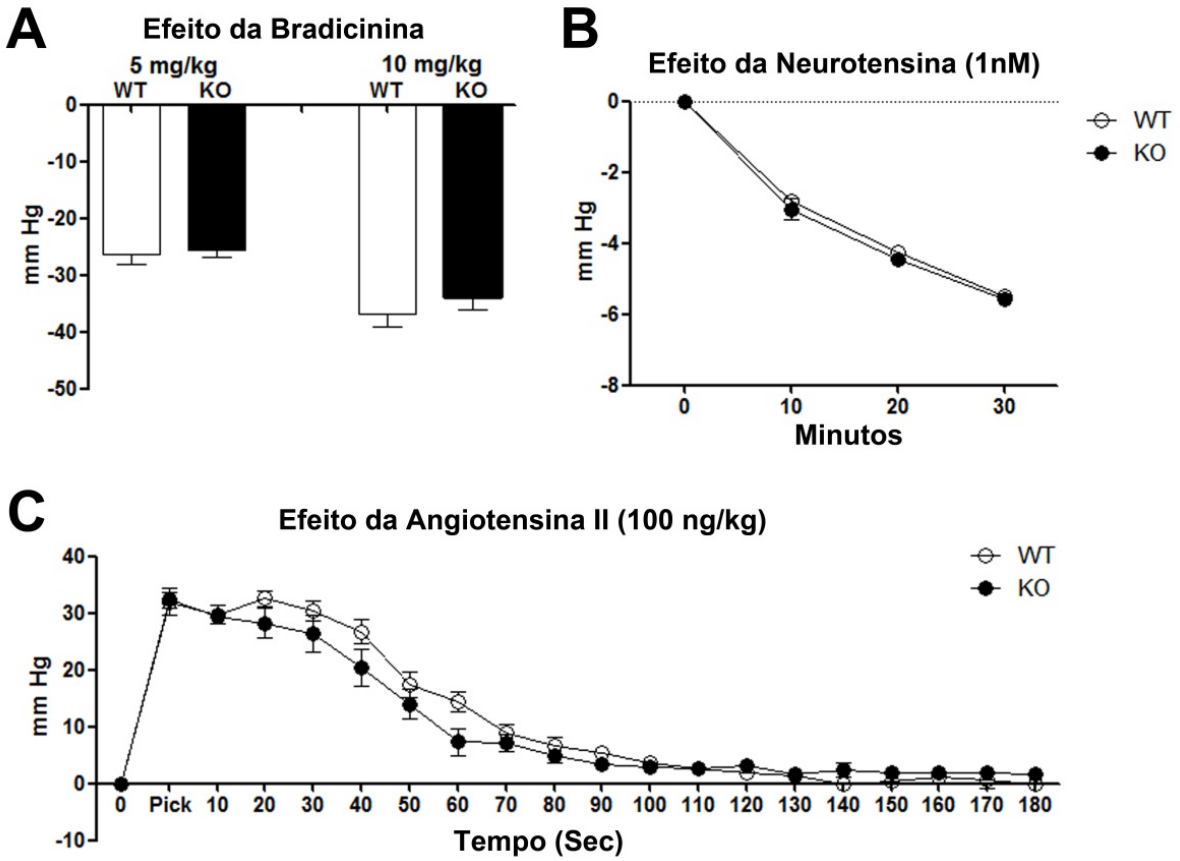

Figura 21A: Pressão arterial (MAP) após administração aguda de bradicinina em diferentes doses (5 mg/kg e 10 mg/kg) em animais KO, comparados com animais WT (n=6). **Figura 21B:** Pressão arterial (MAP) após administração aguda de neurotensina (1nM por animal) mensurada em diferentes tempos em animais KO, comparados com animais WT (n=6). **Figura 21C:** *Time course* da pressão arterial (MAP) após administração aguda de angiotensina II (100 ng/kg) em animais KO comparados com animais WT (n=6).

4.11 Perfil peptídico nos diferentes tecidos

Uma vez que a Nln vem sendo condiderada como uma enzima metabolizadora de peptídeos, realizamos uma análise semi-quantitativa de peptídeos endógenos utilizando marcadores isotópicos do tipo TMAB por LC-ESI MS. Foi assim verificado o perfil global de expressão de peptídeos em diferentes tecidos (músculo estriado esquelético, fígado e tecido adiposo epididimal) de animais KO, quando comparados com animais WT.

Ao todo, foram quantificados 729 espectros peptídeos de MS, incluindo aqueles peptídeos que não foram sequenciados através da análise dos espectros de MS/MS (Tabela 2).

Somente um pequeno número de peptídeos foram considerados aumentados ou diminuídos nos diferentes tecidos analisados quando comparamos os animais KO com os WT (razão KO/WT). Os peptídeos que foram considerados aumentados (possíveis substratos da Nln) apresentaram um valor de razão KO/WT maior ou igual a 2 e os peptídeos que foram cosiderados diminuídos (possíveis produtos da Nln) apresentaram um valor de razão KO/WT menor ou igual a 0,5 (Tabela 2). A quantidade de peptídeo da amostra está relacionada com a altura do pico, sendo assim, picos mais altos representam maiores quantidades e os picos mais baixos menores quantidades. Os resultados gerados aqui são baseados na altura dos picos obtidos de MS marcados com TMABs (Figura 22).

Figura 22 – Representação dos espectros de MS dos peptídeos marcados com D0-, D3- e D9-TMAB.

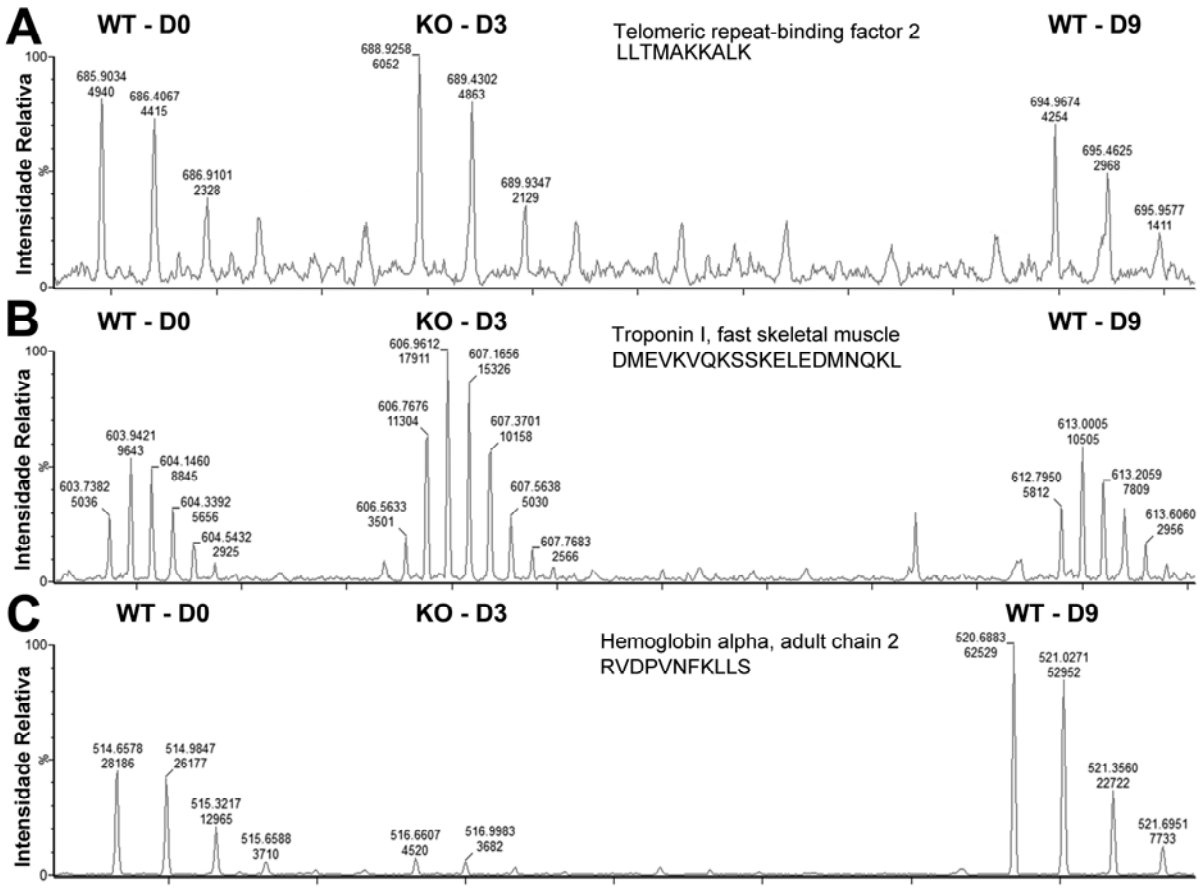

Figura 22A: Exemplo de um espectro de peptídeo fragmento da proteína telomérica, subsequentemente identificado por MSMS como LLTMAKKALK, que não apresentou alteração na intensidade relativa (altura dos picos) indepenpendentes de serem amostras de animais WT ou KO, logo, esse peptídeo nem é um possível substrato e nem produto da Nln. **Figura 22B:** Exemplo de um espectro de peptídeo fragmento de troponina I, subsequentemente identificado por MSMS como DMEVKVQKSSKELEDMNQKL, que apresentou uma redução na intensidade relativa (altura dos picos) dos peptídeos marcados com amostras dos animais WT, quando comparados com os animais KO, sendo assim, esse peptídeo pode ser um possível substrato da Nln. **Figura 22C:** Exemplo de um espectro de peptídeo fragmento da subunidade alfa da hemoglobina, subsequentemente identificado por MSMS como RVDPVNFKLLS, que apresentou uma redução na intensidade relativa (altura dos picos) dos peptídeos marcados com amostras dos animais KO, quando comparados com os animais WT, sendo assim, esse peptídeo pode ser um possível produto da Nln.

Entre os peptídeos identificados, praticamente todos os peptídeos são originados de proteínas intracelulares. No gastrocnêmio, dois peptídeos derivados da troponina I, de músculo estriado esquelético (SADAMLKALLGSKHK e DMEVKVQKSSKELEDMNQKL) estavam aumentados mais do que 2 vezes (Tabela 3). No tecido adiposo epididimal, dois peptídeos distintos, um derivado da proteína acetil coenzima A (VEKVDELKKKYGI) e um derivado da subunidade alfa da hemoglobina (LASVSTVLTSKYR), estavam aumentados mais que duas vezes

(Tabela 3). No fígado, vários peptídeos endocanabinóides contendo a hemopressina (SDLHAHKLRVDPVNFK, RVDPVNFKLLS, VDPVNFKLL, VDPVNFKLLSH e RVDPVNF), ou o antinociceptivo AGH (AGHLDDLPGALSA) apresentaram uma diminuição maior de 0,5 vezes (Tabela 3). No sóleo, apenas o peptídeo FASFPTTK derivado da subunidade alfa da hemoglobina, diminuil mais do que 0,5 vezes (Tabela 3). Nenhum dos peptídeos identificados no gastrocnémio ou no tecido adiposo epididimal diminuiu mais de duas vezes, enquanto que no fígado e sóleo, nenhum dos peptídeos identificados aumentou mais do que duas vezes (Tabela 3).

Tabela 2 – Resumo do perfil global de peptídeos intracelulares quantificados por LC-ESI MS.

	Espectros MS	**≥ 2.0 Aumentados**	**≤ 0.5 Diminuídos**	**≤ 0.5 and ≥ 2.0 sem mudança**
Gastrocnêmio	318	19 (6%)	0 (0%)	299 (94%)
Sóleo	112	2 (2%)	8 (7%)	102 (91%)
Fígado	189	2 (1%)	22 (12%)	165 (87%)
Tecido Adiposo	110	15 (14%)	0 (0%)	95 (86%)

Nota de rodapé: Análise global do perfil de peptídeos intracelulares no sóleo (predominatemente fibras lentas do tipo I), gastrocnêmio (predominantemente fibras rápidas do tipo II), fígado e tecido adipose epididimal quantificados por LC-ESI MS como possíveis substratos (razão KO/WT ≥ 2.0), produtos (razão KO/WT ≤ 0.5) ou não substrato ou produto (razão KO/WT ≥ 0.5 and ≤ 2.0) da Nln. A porcentagem significa a quantidade de peptídeos intracelulares que são ou não possíveis substrates ou produtos da Nln (n=5).

Tabela 3 – Quantificação dos peptídeos intracelulares sequenciados nos diferentes tecidos analisados.

Tecido Adiposo

Nome da Proteína	Sequência do Peptídeo	E	Z	T	Massa Obs.	Massa Teó.	ppm	Razão	±SEM
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	12.63	3	5	1547.87	1547.90	-22	2.90	0.97
Hemoglobin subunit alpha	LASVSTVLTSKYR	14.08	3	2	1423.80	1423.81	-7	2.74	1.04
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	12.63	4	5	1547.85	1547.90	-32	2.68	0.92
Hemoglobin subunit alpha	LASVSTVLTSKYR	14.07	2	2	1423.80	1423.81	-9	2.10	0.70
Acyl-CoA-binding protein	QATVGDVNTDRPGLLDLKGK	12.47	4	3	2096.10	2096.13	-15	1.93	0.59
Hemoglobin subunit alpha	VTLASHHPADFTPAVHASLDKF	14.18	4	2	2360.17	2360.20	5	1.85	0.48
Hemoglobin subunit alpha	ASFPTTK	8.97	2	2	750.38	750.40	-19	1.74	0.52
Hemoglobin subunit alpha	LVTLASHHPADFTPAVHASLDK	13.45	4	2	2326.18	2326.21	-4	1.62	0.46
Motor neuron and pancreas homeobox protein 1	QEAEKQKGGGGGTGKGGSEE	15.19	3	3	1889.98	1889.88	36	1.08	0.13
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II	QLIEAVNNGDFEAYAKI	16.29	2	1	1893.97	1893.95	11	0.98	0.17
Acyl-CoA-binding protein	QATVGDVNTDRPGLLDLK	14.07	3	1	1911.00	1911.01	-5	0.92	0.21
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	11.99	3	4	1547.86	1547.90	-23	0.88	0.22
Growth hormone-releasing hormone receptor	TGTWVGCKLAFE	10.56	2	1	1310.72	1310.64	51	0.88	0.27
Acyl-CoA-binding protein	QATVGDVNTDRPGLLDLKGK	12.47	4	2	2096.12	2096.13	-4	0.84	0.14
Hemoglobin subunit alpha	TYFPHFDVSHGSAQVK	12.47	3	1	1818.87	1818.88	-3	0.75	0.10
Hemoglobin subunit beta-1	NDGLNHLDSLKGTF	14.55	3	1	1529.76	1529.75	3	0.73	0.04
Hemoglobin subunit alpha	FASFPTTKTYFPH	14.30	2	1	1542.75	1542.76	3	0.72	0.10
Hemoglobin subunit beta-1	GDLSSASAIMGNAKVK	12.31	3	3	1547.78	1547.81	-14	0.71	0.10
Hemoglobin subunit alpha	VLSGEDKSNIKA	8.50	3	2	1259.66	1259.68	-12	0.70	0.22
Xin actin-binding repeat-containing protein 1	DAEGTIHEVKAA	10.08	2	1	1239.69	1239.62	58	0.69	0.13
Hemoglobin subunit beta-1	FDSFGDLSSASAIMGNAKVKAHGKKVITA	14.67	5	4	2949.52	2949.55	-8	0.69	0.09

Gastrocnêmio

Nome da Proteína	Sequência do Peptídeo	E	Z	T	Massa Obs.	Massa Teó.	ppm	Razão	±SEM
Troponin I, fast skeletal muscle	SADAMLKALLGSKHK	14.21	5	4	1568.86	1568.88	-13	3.14	1.08
Troponin I, fast skeletal muscle	SADAMLKALLGSKHK	14.21	4	4	1568.77	1568.88	-67	2.87	0.78
Troponin I, fast skeletal muscle	DMEVKVQKSSKELEDMNQKL	13.23	5	5	2378.16	2378.19	-13	2.54	0.44
Troponin I, fast skeletal muscle	DMEVKVQKSSKELEDMNQKL	13.23	4	5	2378.16	2378.19	-14	2.40	0.41
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	NKELDPVQKLF	14.52	3	3	1329.73	1329.74	-7	1.93	0.55
Creatine kinase M-type	LFDKPVSPLLL	20.66	2	2	1240.73	1240.75	-14	1.92	0.15
Fructose-bisphosphate aldolase A	SNEEIAMATVTALRRTVPPAVTGVTF	21.36	3	1	2730.44	2730.44	-3	1.84	0.32
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	LTMFGEKLKGADPEDVITGAF	20.39	3	3	2238.12	2238.13	-6	1.81	0.13
Creatine kinase M-type	IDDHFLFDKPVSPLLL	21.57	3	2	1868.00	1868.02	-9	1.78	0.09
Fructose-bisphosphate aldolase A	SNEEIAMATVTALRRTVPPAVTGVT	19.32	3	1	2583.38	2583.34	15	1.70	0.28
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	TLSQVGDVLRALGTNPTNAEVKKV	17.15	4	3	2509.35	2509.39	-19	1.70	0.09
Phosphoglycerate mutase 1	KDTIARALPF	13.79	3	2	1130.63	1130.65	-18	1.63	0.36
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	DDIKKVVKQASEGPLKGILG	15.78	4	5	2094.19	2094.19	0	1.60	0.13
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	GEKLKGADPEDVITGAFKVLDPEGKGTIKKQF	16.67	6	7	3414.80	3414.85	-14	1.58	0.16
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	SQVGDVLRALGTNPTNAEVKKV	15.07	4	3	2295.24	2295.26	-9	1.54	0.18
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEAFTVIDQNRDGIIDKEDLRDTF	15.23	3	3	2837.42	2837.43	-4	1.52	0.07
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	SQVGDVLRALGTNPTNAEVKKV	15.07	3	3	2295.23	2295.26	-12	1.48	0.18
Phosphoglycerate mutase 2	KDTIARALPF	13.78	2	2	1130.63	1130.65	-22	1.47	0.21
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	12.44	4	5	1547.86	1547.90	-25	1.39	0.26
Hemoglobin subunit alpha	ASVSTVLTSKYR	10.90	3	2	1310.72	1310.73	-3	1.38	0.14
Troponin I, fast skeletal muscle	AATELEKEESRRESEKENY	8.99	4	3	2297.05	2297.05	0	1.37	0.17
Fructose-bisphosphate aldolase A	SYGRALQASALK	9.78	3	2	1263.69	1263.70	1	1.32	0.19
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	VKNEELDAMMKEASGPINFTV	18.95	3	3	2322.10	2322.13	-12	1.32	0.11
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	AAPAPAPAPAPAPAKPKEEK	15.07	4	4	1908.01	1908.05	-24	1.30	0.09

Troponin I, fast skeletal muscle	KQLHAKIDVAEEEK	8.83	4	4	1636.87	1636.89	-11	1.26	0.23
Creatine kinase M-type	KDLFDPIIQDR	14.37	2	2	1358.71	1358.73	-13	1.26	0.03
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	TVIDQNRDGIIDKEDLRDTF	14.53	4	2	2362.17	2362.18	-4	1.24	0.06
Creatine kinase M-type	KDLFDPI	15.23	2	2	846.45	846.46	-10	1.24	0.05
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEAFTVIDQNRDGIIDKEDL	14.52	4	3	2318.17	2318.18	-7	1.23	0.10
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	LGNPSNEEMNAKKIEFEQF	15.08	3	3	2224.03	2224.05	-12	1.19	0.06
Troponin I, fast skeletal muscle	KQLHAKIDVAEEEK	8.82	3	4	1636.86	1636.89	-18	1.19	0.23
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEAFTVIDQNRDGIIDKEDLRDT	13.23	4	3	2690.35	2690.36	-3	1.17	0.07
Acyl-CoA-binding protein	KQATVGDVNTDRPGLLDLKGK	11.37	5	4	2224.19	2224.22	-5	1.15	0.08
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	EAFVKHIMSV	13.39	2	2	1159.60	1159.61	-12	1.13	0.13
Fructose-bisphosphate aldolase A	LEGTLLKPNMVTPGHA	14.05	3	2	1676.90	1676.90	-2	1.13	0.10
Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	DVNIKAPVVLI	12.44	2	1	1179.58	1179.73	-129	1.09	0.09
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	AAPAPAPAPAPAPAKPKEEKIDL	10.89	4	4	2249.23	2249.25	-10	1.08	0.09
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEAFTVIDQNRDGIIDKEDLRDT	13.23	3	3	2690.34	2690.36	-6	1.08	0.06
Hemoglobin subunit alpha	VLSGEDKSNIK	9.16	3	3	1188.62	1188.64	-21	1.05	0.11
Fructose-bisphosphate aldolase A	LEGTLLKPNMVTPGHA	14.05	2	2	1676.89	1676.90	-6	1.04	0.11
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KVLDPEGKGTIKKQ	8.51	4	5	1539.87	1539.91	-23	1.04	0.16
Troponin T, fast skeletal muscle	AERRKPLNIDHL	8.52	3	2	1460.82	1460.83	-4	1.01	0.11
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	KFDDPKFEVIDKPQS	11.96	3	4	1791.88	1791.88	0	0.98	0.11
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	KFDDPKFEVIDKPQS	11.96	4	4	1791.88	1791.91	-15	0.98	0.11
Telomeric repeat-binding factor 2	LLTMAKKALK	12.91	2	2	1115.59	1115.72	-116	0.98	0.08
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	RVPTPNVSVV	11.81	2	1	1066.61	1066.62	-13	0.95	0.09
Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	AAPAPAPAPAPAPAKPKEEK	8.51	4	4	1908.03	1908.05	-1	0.94	0.09
Hemoglobin subunit beta-1	GDLSSASAIMGNAKVK	12.12	3	3	1547.80	1547.81	-6	0.92	0.08
Inversin	MENNADPNI	10.10	2	1	1016.51	1016.43	81	0.90	0.07
Fructose-bisphosphate aldolase A	VTEKVLAAV	14.37	2	2	928.55	928.57	-14	0.89	0.05

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	RVPTPNVSVVDL	15.08	2	1	1294.73	1294.73	-5	0.88	0.10
Proteasome-associated protein ECM29 homolog	LGDIPLKTKEGAVL	14.69	2	1	1452.73	1452.86	-94	0.85	0.07
Fructose-bisphosphate aldolase	GEHTPSALAI	11.38	2	1	994.51	994.52	-3	0.83	0.05
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	DDPKFEVIDKPQS	11.53	3	3	1516.73	1516.75	-9	0.82	0.06
Syntenin-1	LEDLKVDK	12.61	2	2	958.51	958.54	-27	0.81	0.06
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEAFTVIDQN	11.96	2	2	1163.57	1163.59	-18	0.80	0.02
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	KQASEGPLKGILG	12.61	3	3	1296.72	1296.75	-24	0.78	0.08
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEASGPINFTV	13.94	2	2	1161.59	1161.61	-18	0.78	0.06
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	KEAFTV	10.09	2	2	693.36	693.38	-11	0.77	0.04
myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	GEKLKGADPEDVITGA	12.27	3	3	1598.80	1598.82	-13	0.68	0.06

Fígado

Nome da Proteína	Sequência do Peptídeo	E	Z	T	Massa Obs.	Massa Teó.	ppm	Razão	±SEM
acyl-CoA-binding protein isoform 2	GTSKESAMKTYVEKVDELKKKY	13.53	6	7	2561.30	2561.35	-19	1.78	0.44
acyl-CoA-binding protein isoform 2	GTSKESAMKTYVEKVDELKKKYGI	15.74	6	7	2731.41	2731.45	-17	1.68	0.36
hemoglobin alpha, adult chain 2	VTLASHHPADFTPAVHASLDKFIASVSTVLTSKYR	22.47	6	3	3765.94	3765.99	-15	1.58	0.40
Mus musculus peroxiredoxin V (PrxV)	APIKVGDAIPSVEVF	18.35	2	2	1540.83	1540.86	-10	1.45	0.08
hemoglobin alpha, adult chain 2	ASHHPADFTPAVHASLDKFLASVSTVL	22.78	4	2	2817.42	2817.45	-12	1.21	0.21
hemoglobin alpha, adult chain 2	ASHHPADFTPAVHASLDKFIASVSTVLTSKYR	21.55	5	3	3452.77	3452.79	-6	1.17	0.17
non-specific lipid-transfer protein	NLQLQPGKAKL	10.56	3	3	1208.69	1208.73	-32	1.16	0.28
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like	EDENFILKHTGPGILSM	17.16	3	2	1899.92	1899.95	-6	1.10	0.16
formimidoyltransferase-cyclodeaminase	EAKTQAALVLGSLEARKE	13.69	4	3	1913.02	1913.07	-8	1.09	0.13
hemoglobin alpha, adult chain 2	ASFPTTKTYFPHFDVS	16.19	3	2	1843.87	1843.89	-6	1.06	0.24
ubiquinol-cytochrome c reductase	TVGLNVPASVRF	16.00	2	1	1258.69	1258.71	-7	0.95	0.10
sterol carrier protein-2	ADSDLLALMTGKMNPQSA	21.00	3	2	1861.88	1861.90	-2	0.87	0.08
apolipoprotein A-II	SSLMNLEEKPAPAA	12.90	2	2	1456.71	1456.73	-11	0.85	0.09

hemoglobin alpha, adult chain 2	VLSGEDKSNIKAAWGKIGGHGAEYGAEAL	15.15	5	4	2927.45	2927.49	-7	0.83	0.23
acyl-CoA-binding protein isoform 2	TVGDVNTDRPGLLDL	16.92	2	1	1583.81	1583.82	-2	0.81	0.07
sterol carrier protein-2	SSAGDGFKANLVF	16.19	2	2	1311.64	1311.65	-10	0.81	0.05
Cps1 protein, partial	TNFQVTKL	11.79	2	2	949.47	949.53	-56	0.75	0.08
acyl-CoA-binding protein isoform 2	KQATVGDVNTDRPGLLDL	14.55	3	2	1910.99	1911.01	-11	0.74	0.07
hemoglobin alpha, adult chain 2	VLSGEDKSNIK	8.98	3	3	1188.61	1188.64	-25	0.73	0.13
cytochrome c oxidase subunit Va preprotein	RPTLNELGISTPEELGLDKV	17.34	3	2	2180.15	2180.18	-11	0.73	0.08
unnamed protein product	ANAAGHLDDLPGALSALSDLHAHKL	16.73	3	2	2506.29	2506.30	-4	0.72	0.16
seizure related 6 homolog like 2, isoform CRA_a	LSCAWIEGLPLK	15.02	2	1	1328.71	1328.72	-11	0.68	0.03
hemoglobin alpha, adult chain 2	SLDKFLASVSTVL	24.21	2	2	1378.76	1378.78	-16	0.67	0.15
mKIAA0099 protein	RGNVLVL	10.57	2	1	769.47	769.49	-21	0.67	0.02
hemoglobin alpha, adult chain 2	ADALANAAGHLDDLPGALSAL	21.98	2	1	1974.99	1975.01	-11	0.67	0.18
cytochrome c oxidase subunit 6B1	AWDDRIAEGTFPGKI	15.45	3	2	1674.82	1674.84	-15	0.66	0.05
hemoglobin alpha, adult chain 2	AGHLDDLPGALSALSDLHAH	17.11	4	1	2008.98	2009.00	-11	0.65	0.13
hemoglobin alpha, adult chain 2	ADALANAAGHLDDLPGALSALSDLHAHKL	20.09	4	2	2876.45	2876.49	-12	0.64	0.15
hemoglobin alpha, adult chain 2	AGHLDDLPGALSALSDLHAHKL	16.63	3	2	2250.16	2250.18	-4	0.62	0.09
hemoglobin alpha, adult chain 2	SVSTVLTSK	10.41	2	2	920.51	920.53	-22	0.61	0.12
hemoglobin alpha, adult chain 2	ANAAGHLDDLPGALSALSDLHAHKL	16.73	4	2	2506.28	2506.30	-2	0.59	0.13
hemoglobin alpha, adult chain 2	ADALANAAGHLDDLPGALSA	18.79	2	1	1861.91	1861.92	-6	0.59	0.14
hemoglobin alpha, adult chain 2	ANAAGHLDDLPGALSAL	18.57	2	1	1604.81	1604.82	-6	0.59	0.13
cytochrome c oxidase subunit Va preprotein	GISTPEELGLDKV	15.58	2	2	1356.70	1356.72	-16	0.58	0.07
hemoglobin alpha, adult chain 2	ANAAGHLDDLPGALSA	14.56	2	1	1491.73	1491.74	-8	0.56	0.09
hemoglobin alpha, adult chain 2	RVDPVNFK	9.46	3	2	973.53	973.54	-16	0.56	0.12
hemoglobin alpha, adult chain 2	VDPVNFKLLS	16.99	2	2	1130.62	1130.64	-20	0.55	0.14
hemoglobin alpha, adult chain 2	VDPVNFKLLSH	14.72	3	2	1267.68	1267.70	-15	0.54	0.11
hemoglobin alpha, adult chain 2	SFPTTKTYFPHFDVS	16.00	3	2	1772.81	1772.85	-22	0.54	0.11

hemoglobin alpha, adult chain 2	AGHLDDLPGALSALSDLHAHKL	16.63	4	2	2250.17	2250.18	-8	0.53	0.10
hemoglobin alpha, adult chain 2	SVSTVLTSKYR	10.41	3	2	1239.67	1239.69	-19	0.53	0.14
protease-activated receptor 3	SFSLLMCG	10.08	2	1	856.40	856.39	14	0.51	0.11
hemoglobin alpha, adult chain 2	SDLHAHKLRVDPVNFK	9.92	3	3	1874.99	1875.02	-16	0.49	0.07
hemoglobin alpha, adult chain 2	RVDPVNFKLLS	14.31	3	2	1286.72	1286.74	-14	0.48	0.11
hemoglobin alpha, adult chain 2	VDPVNFKLL	17.62	2	2	1043.59	1043.61	-21	0.48	0.13
hemoglobin alpha, adult chain 2	VDPVNFKLLSH	14.72	2	2	1267.68	1267.70	-18	0.48	0.09
hemoglobin alpha, adult chain 2	AGHLDDLPGALSA	14.38	2	1	1235.60	1235.62	-2	0.46	0.06
hemoglobin alpha, adult chain 2	RVDPVNF	11.37	2	1	845.43	845.45	-17	0.46	0.06

Sóleo

Nome da Proteína	Sequência do Peptídeo	E	Z	T	Massa Obs.	Massa Teó.	ppm	Razão	±SEM
Syntenin-1	LEDLKVDK	13.85	2	2	958.52	958.54	-12	1.50	0.11
E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	ETQILED	16.72	2	1	846.45	846.40	48	1.22	0.28
Troponin T, fast skeletal muscle	LSDDKLRDKAKE	9.98	4	3	1416.73	1416.76	-1	1.19	0.10
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	13.10	5	4	1547.86	1547.90	-10	0.89	0.07
Small muscular protein	SEIQNVKSELKFVPKGEQ	14.25	3	3	2059.07	2059.10	-6	0.83	0.05
Hemoglobin subunit alpha	ASVSTVLTSKYR	11.61	2	1	1310.71	1310.73	-15	0.82	0.21
Hemoglobin subunit alpha	LASVSTVLTSKYR	13.48	2	1	1423.79	1423.81	4	0.82	0.17
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	13.10	4	4	1547.87	1547.90	-20	0.77	0.05
Hemoglobin subunit alpha	ASVSTVLTSKYR	11.61	3	1	1310.72	1310.73	-7	0.75	0.15
Acyl-CoA-binding protein	VEKVDELKKKYGI	13.10	3	4	1547.86	1547.90	-24	0.74	0.05
FAST kinase domain-containing protein 5	GAQLRFKQVGVS	21.38	2	1	1288.72	1288.73	-2	0.70	0.08
Myoglobin	RNDIAAKYKELGFQG	13.68	3	2	1708.89	1708.90	-6	0.64	0.08
Hemoglobin subunit alpha	ASHHPADFTPAVHASLDK	10.46	3	1	1899.93	1899.93	-2	0.62	0.14
Hemoglobin subunit alpha	ASHHPADFTPAVHASLDK	10.46	4	1	1899.93	1899.93	2	0.61	0.14

Acyl-CoA-binding protein	KQATVGDVNTDRPGL	10.29	3	1	1569.81	1569.82	-5	0.60	0.08
Hemoglobin subunit beta-1	NDGLNHLDSLKGT	11.76	2	1	1382.68	1382.69	-6	0.58	0.07
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange	QELGMSN	10.29	2	1	777.39	777.34	66	0.57	0.10
Hemoglobin subunit beta-1	NDGLNHLDSLKGTFASL	18.46	3	1	1800.89	1800.91	0	0.56	0.12
Hemoglobin subunit alpha	LASVSTVLTSK	13.74	2	1	1104.63	1104.65	5	0.56	0.10
Hemoglobin subunit alpha	FASFPTTK	12.07	2	1	897.45	897.47	-2	0.49	0.06

Nota de rodapé: A tabela representa os peptídeos intracelulares identificados com suas proteínas precursoras, sequência dos peptídeos, tempo de eluição (E), carga (Z), número de isótopos incorporados no peptídeo (T), massa observada, massa teórica, razão (KO/WT) que é a média da intensidade relativa dos peptídeos marcados dos animais KO, comparados com os animais WT seguido do ±SEM. Os resultados estão expressos em ordem decrescente da razão (WT/KO).

4.12 Ensaio de hidrólise dos peptídeos identificados como possíveis substratos da Nln

Baseados nos dados da tabela 3, quatro peptídeos identificados, sendo dois derivados da troponina I, de músculo estriado esquelético (SADAMLKALLGSKHK e DMEVKVQKSSKELEDMNQKL) no gastrocnêmio, um derivado da proteína acetil coenzima A (VEKVDELKKKYGI) e outro derivado da subunidade alfa da hemoglobina (LASVSTVLTSKYR) no tecido adiposo epididimal, estavam aumentados mais que duas vezes. Sendo assim, esses peptídeos podem ser definidos como possíveis substratos da Nln, uma vez que na ausência da enzima eles estavam aumentados.

Com o intuito de analisar se esses peptídeos realmente eram substratos diretos da Nln, realizamos as reações de cinética de ordem zero a 37 °C na presença da Nln recombinante para cada um dos peptídeos identificados e quimicamente sintetizados. Contudo, embora esses peptídeos estivessem aumentados nos animais KO, com excessão de LASVSTVLTSKYR, todos os peptídeos identificados apresentaram 0% de hidrólise na presença da Nln recombinante (Tabela 4). Nas mesmas condições, a bradicinina, considerada um ótimo substrato da Nln, apresentou entre 63% e 91% de hidrólise, nos tempos 30 e 90 min, respectivamente. O peptídeo LASVSTVLTSKYR apresentou uma hidrólise de 11% e 19% nos tempos de 30 e 90 min, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentual de hidrólise relativa dos peptídeos identificados como possíveis substratos da Nln.

Peptídeo	% de Hidrólise 30 min	% de Hidrólise 60 min
Bradicinina	63	91
SADAMLKALLGSKHK	0	0
DMEVKVQKSSKELEDMNQKL	0	0
VEKVDELKKKYGI	0	0
LASVSTVLTSKYR	11	19

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, os animais KO para Nln foram gerados utilizando a estratégia *Gene Trap* e verificamos a influência da ausência dessa enzima no metabolismo da glicose, exercício físico, pressão arterial e no metabolismo de peptídeos intracelulares. De todos os fenótipos estudados, os animais KO, quando comparados com os animais WT, apresentaram uma pequena, porém significante, redução do peso corporal, aumento na tolerância à glicose, maior sensibilidade à insulina assim como maior gliconeogênese. Adicionalmente, esses animais mostraram uma redução na resistência ao exercício físico de exaustão, uma diminuição nas fibras musculares lentas do tipo I no músculo gastrocnêmio, e uma diferença na composição de peptídeos intracelulares específicos nos órgãos analisados.

A Nln é uma oligopeptidase suposta em participar de vários processos fisiológicos importantes, como homeostase cardiovascular e renal, controle da dor, regulação da reprodução e mais recentemente a Nln tem sido demonstrada participar do controle do acidente cardiovascular cerebral (NORMAN et al., 2003; RASHID et al., 2013; SHRIMPTON; SMITH; LEW, 2002; SMITH et al., 2000; VINCENT et al., 1997). Estudos utilizando shRNA ou inibidores químicos têm corroborado o envolvimento da Nln nesses processos fisiológicos (NORMAN et al., 2003; PILIPONSKY et al., 2008; RASHID et al., 2013). Embora a Nln seja altamente expressa no tecido nervoso central e em todos os tecidos periféricos (BARRETT et al., 1995; KRAUSE et al., 1997; MASSARELLI et al., 1999), sua ausência não foi letal em camundongos.

Os animais KO para Nln não mostraram nenhuma anormalidade óbvia, eles são altamente semelhantes aos animais WT em aparência geral, exceto no peso corporal, onde eles apresentaram uma leve, porém significante, redução quando comparados com os animais WT. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores utilizando animais transgênicos expressando 3 cópias do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA), e alimentados com dieta hiperlipídica, que apresentam um menor peso corporal e do tecido adiposo epididimal quando comparados com os animais expressando 1 ou 2 cópias do gene da ECA (HEIMANN et al., 2005). Quando alimentados com uma dieta normal, os camundongos contendo 3 cópias do gene da ECA se alimentam mais para manter o

mesmo peso corporal. Quando desafiados com uma dieta hiperlipídica, esses mesmos animais se alimentam na mesma quantidade dos animais com 1 ou 2 cópias do gene ECA, sugerindo que esses animais apresentam uma maior taxa no metabolismo basal. As mudanças fenotípicas observadas nos animais transgênicos da ECA não foram afetadas pelo losartan, que é um antagonista dos receptores de angiotensina II, sugerindo que o sistema renina angiotensina não foi afetado por esse fenótipo (HEIMANN et al., 2005). A atividade enzimática da Nln foi significativamente reduzida no tecido adiposo de animais com 3 cópias do gene ECA, quando comparado aos outros animais controle. Esses dados foram correlacionados com a diferença no perfil de peptídeos intracelulares desses animais, sugerindo um novo mecanismo celular, onde peptídeos intracelulares podem aumentar a sensibilidade à insulina no tecido adiposo dos animais transgênicos da ECA (HEIMANN et al., 2005). Adicionalmente, ratos Wistar desafiados com uma dieta hipercalórica do tipo cafeteria pesam mais que os animais alimentados com dieta controle, e ainda apresentaram um discreto aumento na atividade enzimática da Nln no tecido adiposo epididimal e no músculo gastrocnêmio (BERTI, 2010).

Embora os animais KO não tenham mostrado nenhuma diferença nos níveis de glicose basal, esses animais mostraram uma melhora em todos os parâmetros metabólicos analisados, sugerindo fortemente que a enzima Nln tenha uma participação fisiológica na homeostase energética. Vários estudos anteriores estão correlacionados com uma melhora de perfil metabólico após a perda da atividade de peptidases (HEIMANN et al., 2005; MEST; MENTLEIN, 2005; TAGORE et al., 2009). Por exemplo, os camundongos $Cpe^{fat/fat}$ apresentam um fenótipo de obesidade e hiperproinsulinemia (NAGGERT et al., 1995). Além disso, o processamento de peptídeos nos camundongos $Cpe^{fat/fat}$ é prejudicado, ocorrendo um acúmulo de peptídeos intermediários que contém resíduos básicos (arginina e/ou lisinas) na porção C-terminal (CHE; BISWAS; FRICKER, 2005; NAGGERT et al., 1995). Diferentemente, os camundongos deficientes em DPP4 são resistentes ao desenvolvimento de adiposidade e obesidade induzida por dieta rica em gordura (MEST; MENTLEIN, 2005). Ainda, os animais deficientes em DPP4 apresentaram uma melhora na secreção de insulina e tolerância a glicose (MARGUET et al., 2000; MEST; MENTLEIN, 2005; TAGORE et al., 2009). Adicionalmente, os animais deficientes em DPP4, assim como animais normais tratados com inibidores seletivos

de DPP4 (LAF-237), apresentaram um aumento nos peptídeos RPGLLDLKAKWD (DBI) e LPAPEKFVKDIDGGIDQDIFD, provenientes das proteínas ligadora de acilCoA e *meprin-β* (Mepβ), respectivamente (TAGORE et al., 2009; VILLHAUER et al., 2003).

O metabolismo da glicose é vital para a saúde e é um dos mais importantes combustíveis para as funções fisiológicas (RICHTER; HARGREAVES, 2013). A insulina é secretada pelas células beta do pâncreas, e regula o metabolismo da glicose depois da ingestão de alimento, aumentando a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, e ainda diminuindo a produção de glicose hepática bloqueando a glicogenólise e gliconeogênese no fígado (SALTIEL; KAHN, 2001). O maior efeito da resposta à insulina é o aumento da captação de glicose, que pode ser induzido a partir da fosforilação de AKT promovendo a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (NG et al., 2008; TAN; NG; JAMES, 2010; TIAN, 2005). Os animais KO apresentaram um aumento na tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina. Um provável efeito que pode estar relacionado com o aumento da sensibilidade a insulina e da tolerância à glicose nesses animais é o aumento da fosforilação de AKT. Tanto o tecido adiposo como o músculo estriado esquelético (gastrocnêmio) desses animais apresentou um aumento da fosforilação de AKT após o estímulo com insulina. A falta de mudanças nos níveis de fosforilação de AKT após estímulo com insulina no fígado, pode explicar os níveis de glicose basal semelhantes dos animais KO quando comparados com os animais WT. Assim, como nos testes de tolerância a glicose e de tolerância à insulina, os animais KO apresentaram um maior aumento da produção de glicose a partir do piruvato (gliconeogênese) pelo fígado. Esses resultados estão de acordo com o aumento da expressão de genes específicos da gliconeogênese no fígado (AUTHIER; DESBUQUOIS, 2008; CORSSMIT; ROMIJN; SAUERWEIN, 2001; JITRAPAKDEE, 2011; MAYR; MONTMINY, 2001). Sendo assim, os dados apresentados aqui sugerem o papel dessa enzima no contexto metabólico como um todo.

O tecido muscular esquelético é o maior tecido responsável pela captação de glicose. Assim como a insulina, a contração muscular é capaz de estimular o transporte da glicose no músculo esquelético (POMMERY; HENICHART, 2005; RYDER et al., 1999). Além disso, uma grande característica do tecido muscular é a sua capacidade de plasticidade em resposta ao ambiente, mudando as suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (BASSEL-DUBY; OLSON,

2006). Enquanto o exercício de resistência promove o aumento de fibras do tipo I, exercícios de alto desempenho estão relacionados com aumento da hipertrofia de fibras do tipo II (GOLLNICK et al., 1972; WANG et al., 2005). Nesse estudo, submetemos os animais KO a um teste de treinamento de alta ou baixa intensidade em uma esteira graduada, e os animais KO apresentaram uma menor resistência ao exercício físico de baixa intensidade quando comparados com os animais KO.

Além da melhora em todos os perfis metabólicos avaliados, e ainda a redução na resistência ao exercício físico de exaustão, os animais KO para Nln mostraram um remodelamento na composição de fibras musculares do músculo estriado esquelético, com a redução das fibras do tipo I no músculo gastrocnêmio. Consistente com esses resultados, outros estudos têm demonstrado uma melhora no perfil metabólico relacionado com uma remodelação da composição de fibras musculares (CHEN et al., 2010; IZUMIYA et al., 2008).

O músculo gastrocnêmio possui mais fibras rápidas do tipo II enquanto que o sóleo apresenta uma maior quantidade de fibras do tipo I (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006), aqui avaliamos a composição de fibras musculares em ambos os músculos (gastrocnêmio e sóleo). Embora o músculo sóleo dos animais WT apresente uma maior atividade enzimática da Nln quando comparado com o músculo gastrocnêmio, a ausência da Nln foi capaz de promover uma remodelação da composição de fibras musculares no músculo gastrocnêmio, mas nenhuma alteração no músculo sóleo. Apenas o músculo gastrocnêmio apresentou uma redução significativa de genes como Myh7, específico de fibras musculares do tipo I. Esses dados foram corroborados por análises da composição de fibras musculares por histoquímica, onde avaliamos a atividade mitocondrial para succinato desidrogenase (SDH) e citocromo oxidase (COX) no gastrocnêmio.

Os animais KO para Nln mostraram uma redução nos níveis de fibras do tipo I no gastrocnêmio e não no sóleo, esses resultados podem estar relacionados com uma melhora dos perfis metabólicos desses animais. De fato, vários estudos demonstraram que o perfil de composição de fibras musculares esqueléticas é altamente importante para o contexto metabólico (ABOU MRAD et al., 1992; GOLLNICK et al., 1972; HICKEY et al., 1995; HOLT et al., 2012; IZUMIYA et al., 2008; TANNER et al., 2002; WANG et al., 2005). Embora seja bem estabelecido que fibras do tipo I podem atuar no metabolismo de glicose e lipídeos, a remodelação e hipertrofia das fibras do tipo II desempenham um papel relevante no metabolismo da

glicose, assim, ambos os tipos de fibras podem contribuir de uma forma geral para o contexto metabólico (ABOU MRAD et al., 1992; FRITAH et al., 2012; IZUMIYA et al., 2008; NADER; ESSER, 2001; WANG et al., 2005; WILLIAMSON et al., 2001). Além disso, o menor desempenho nos testes de resistência física bem como uma diminuição da composição de fibras musculares lentas do tipo I, sugerem que a Nln pode estar mais ligada ao metabolismo oxidativo durante o exercício físico.

Os animais KO apresentaram reprodução normal e pressão arterial e frequência cardíaca semelhante aos animais WT. Tem sido previamente sugerido que *in vivo* a Nln contribui para o metabolismo de uma série de peptídeos endógenos, incluindo neurotensina, bradicinina, angiotensinas, substância P, peptídeos opióides (por exemplo, a metorfamida e dinorfina A_{1-8}), somatostaina e hemopressinas (RIOLI et al., 2003; RIOLI et al., 1998; SHRIMPTON; SMITH; LEW, 2002; VINCENT et al., 1997). Além disso, a presença da Nln no endotélio de células vasculares sugerem a possibilidade do papel fisiológico da Nln no controle da pressão arterial (NORMAN et al., 2003). Contudo, mesmo depois da injeção de alguns desses neuropeptídeos (bradicinina, angiotensina II e neurotensina), os animais KO apresentaram os mesmos comportamentos da pressão arterial quando comparados com os animais WT. Esses dados sugerem que a Nln não é uma enzima chave no controle da pressão arterial, e que sua função metobólica possa ser compensada por outras peptidases.

Outro fenótipo dos animais KO é a alteração nos níveis de peptídeos intracelulares específicos nos diferentes órgãos analisados. Por se tratar de uma oligopeptidase, a Nln hidrolisa apenas peptídeos contendo entre ~5-17 aminoácidos (BROWN et al., 2001; RAY; HINES; RODGERS, 2002). Contudo, embora os peptídeos identificados, com exceção do peptídeo DMEVKVQKSSKELEDMNQKL, tivessem apresentado tamanho ótimo para serem substratos da Nln, apenas o peptídeo LASVSTVLTSKYR apresentou hidrólise na presença da Nln recombinante. Esses resultados sugerem que pode estar havendo uma influência da falta da Nln sobre outras peptidases. Portanto, é possível sugerir que os fenótipos observados aqui, sejam decorrentes da ausência do metabolismo de peptídeos específicos pela Nln e outras peptidases. Enquanto a ausência da Nln afeta os fenótipos indiretamente, os peptídeos alterados afetariam esses fenótipos diretamente. Essa possibilidade nos remete a um questionamento de como esses peptídeos poderiam alterar esses fenótipos.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório sugerem que os peptídeos intracelulares possam agir ativamente em redes de interação proteína-proteína que participam de todas as funções celulares (FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004). De acordo com essa hipótese, peptídeos intracelulares se ligam a proteínas alterando a sua capacidade de interação a outras proteínas. De fato, trabalhos já mostraram que a introdução ou mudança do perfil de peptídeos intracelulares altera o funcionamento de redes específicas de sinalização, como por exemplo, a transdução de sinal de GPCRs estimulados com agonistas como angiotensina II ou isoproterenol (CUNHA et al., 2008; RUSSO et al., 2012b). Além disso, outros grupos também têm demonstrado a participação de peptídeos gerados intracelularmente na regulação de respostas celulares. Por exemplo, em *Caenorhabditis elegans*, peptídeos produzidos de proteínas mitocondriais foram capazes de ativar genes de chaperonas mitocondriais codificados no núcleo e regular o stress mitocondrial de proteínas mal formadas (HAYNES et al., 2010). Em drosófila, peptídeos codificados diretamente de curtos *open reading frames* controlam a diferenciação da epiderme pela modificação da atividade de fatores de transcrição (KONDO et al., 2010). Recentemente, foi demonstrado que alguns peptídeos intracelulares estão aumentados no tecido adiposo de ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica do tipo cafeteria. Esses peptídeos intracelulares foram reintroduzidos em células adipócitos 3T3-L1 (tratados ou não com palmitato para induzir resistência à insulina) e mostraram um aumento da captação de glicose após estímulo com insulina (BERTI et al., 2012). Assim, os peptídeos intracelulares mostraram serem capaz de facilitar a captação de glicose induzida por insulina em adipócitos 3T3-L1 (BERTI et al., 2012).

Nesse trabalho demonstramos que peptídeos intracelulares específicos estavam aumentados ou diminuídos nos diferentes tecidos dos animais KO quando comparados com os WT. Assim, embora mais estudos sejam necessários, podemos sugerir que a alteração na expressão de genes específicos e as mudanças observadas nos fenótipos obtidos podem ser consequências da alteração do perfil de peptídeos intracelulares nos animais KO. Nesse modelo, os peptídeos intracelulares encontrados alterados nos animais KO estariam se ligando a proteínas específicas que direta ou indiretamente modulam a expressão gênica no fígado e músculo, bem como a sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo.

Trabalhos futuros deverão ser realizados, por exemplo, tentando identificar os alvos dos peptídeos que encontramos alterados nesse trabalho.

6 CONCLUSÃO

- Os animais KO para Nln foram gerados com sucesso e não apresentam expressão do gene, da proteína ou da atividade enzimática relacionada à Nln.

- Os animais KO para Nln são viáveis, se reproduzem normalmente e são semelhantes aos animais WT em aparência geral, apresentando apenas uma pequena redução no peso corporal.

- Os animais KO para Nln são mais tolerantes à glicose, mais sensíveis à insulina, apresentam um aumento nos níveis de gliconeogênese. Além disso, esses animais KO são menos tolerantes ao exercício de resistência e apresentaram uma redução das fibras musculares do tipo I no músculo gastrocnêmio.

- Os animais KO para Nln não apresentaram nenhuma alteração nos níveis da pressão arterial e frequência cardíaca basal ou quando estimulados com diferentes neuropeptídios.

- Os animais KO para Nln apresentaram uma alteração na composição de peptídeos intracelulares específicos nos tecidos analisados (gastrocnêmio, sóleo, fígado e tecido adiposo epididimal).

- Em conclusão, esses dados sugerem que a Nln tem uma participação no metabolismo energético e oxidativo. Além disso, a Nln participa do metabolismo de peptídeos intracelulares. Esses peptídeos intracelulares podem estar mediando diretamente os fenótipos encontrados, ligando-se a proteínas específicas e alterando a sua função celular.

REFERÊNCIAS*

ABOU MRAD, J. et al. Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats. **Am. J. Physiol.**, v. 262, n. 4 Pt 2, p. R684-688, 1992.

AGIUS, L. et al. Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 48, p. 30479-30486, 1996.

ANUBHUTI; ARORA, S. Leptin and its metabolic interactions: an update. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 10, n. 11, p. 973-993, 2008.

AUTHIER, F.; DESBUQUOIS, B. Glucagon receptors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 12, p. 1880-1899, 2008.

BANFI, G. et al. Metabolic markers in sports medicine. **Adv. Clin. Chem.**, v. 56, p. 1-54, 2012.

BARELLI, H. et al. Role of endopeptidase-3.4.24.16 in the catabolism of neurotensin, in-vivo, in the vascularly perfused dog ileum. **Brit. J. Pharmaco.,** v. 112, n. 1, p. 127-132, 1994.

BARRETT, A. J. Bioinformatics of proteases in the merops database. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v. 7, n. 3, p. 334-341, 2004.

BARRETT, A. J. et al. Thimet oligopeptidase and oligopeptidase-m or neurolysin. In:_____ **Proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases**. Orlando: Academic Press, 1995. v. 248, p. 529-556.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 373, n. 7, p. 353-360, 1992.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. 'species' of peptidases. **Biol. Chem.**, v. 388, n. 11, p. 1151-1157, 2007.

BARROS, C. C. et al. Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. **Lab. Invest.**, v. 92, n. 10, p. 1419-1427, 2012a.

BARROS, C. C. et al. Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012b.

BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 75, p. 19-37, 2006.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERTI, Denise Aparecida. **Peptídeos intracelulares na obesidade e resistência à insulina**. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de são Paulo, 2010. Disponível em http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-19052010-131337/.

BERTI, D. A. et al. Identification of intracellular peptides in rat adipose tissue: Insights into insulin resistance. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2668-2681, 2012.

BLAIS, P. A. et al. Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice. A comparative study. **Peptides**, v. 26, n. 8, p. 1317-1322, 2005.

BROWN, C. K. et al. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, n. 6, p. 3127-3132, 2001.

BUCKINGHAM, M. et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J. Anat.**, v. 202, n. 1, p. 59-68, 2003.

BULLER, A. J.; ECCLES, J. C.; ECCLES, R. M. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. **J. Physiol.**, v. 150, p. 399-416, 1960.

CAMARGO, A. C.; CALDO, H.; REIS, M. L. Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 12, p. 5304-5307, 1979.

CAMARGO, A. C.; SHAPANKA, R.; GREENE, L. J. Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. **Biochemistry**, v. 12, n. 9, p. 1838-1844, 1973.

CARDOSO, C. C. et al. Increased blood pressure and water intake in transgenic mice expressing rat tonin in the brain. **Biol. Chem.**, v. 391, n. 4, p. 435-441, 2010.

CASTRO, C. H. M. et al. Targeted expression of a dominant-negative n-cadherin in vivo delays peak bone mass and increases adipogenesis. **J. Cell Sci.**, v. 117, n. 13, p. 2853-2864, 2004.

CHAOLU, H. et al. Effect of exercise and high-fat diet on plasma adiponectin and nesfatin levels in mice. **Exp. Ther. Med.**, v. 2, n. 2, p. 369-373, 2011.

CHARLI, J. L. et al. Pyroglutamyl peptidase ii inhibition specifically increases recovery of trh released from rat brain slices. **Neuropeptides**, v. 14, n. 3, p. 191-196, 1989.

CHE, F. Y.; BISWAS, R.; FRICKER, L. D. Relative quantitation of peptides in wild-type and cpe(fat/fat) mouse pituitary using stable isotopic tags and mass spectrometry. **J. Mass. Spectrom.**, v. 40, n. 2, p. 227-237, 2005.

CHECLER, F. Experimental stroke: Neurolysin back on stage. **J. Neurochem.**, DOI: 10.1111/jnc.12635 [E-pub ahead of print]. 2014.

CHECLER, F. et al. Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the pro10-tyr11 bond by endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and a peptidase different from proline-endopeptidase. **J. Neurochem.**, v. 43, n. 5, p. 1295-1301, 1984.

CHECLER, F.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. Degradation of neurotensin by rat brain synaptic membranes: Involvement of a thermolysin-like metalloendopeptidase (enkephalinase), angiotensin-converting enzyme, and other unidentified peptidases. **J. Neurochem.**, v. 41, n. 2, p. 375-384, 1983.

CHECLER, F.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 24, p. 11274-11281, 1986.

CHEN, W. et al. A muscle-specific knockout implicates nuclear receptor coactivator med1 in the regulation of glucose and energy metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 22, p. 10196-10201, 2010.

CORSSMIT, E. P.; ROMIJN, J. A.; SAUERWEIN, H. P. Review article: regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. **Metabolism**, v. 50, n. 7, p. 742-755, 2001.

CUNHA, F. M. et al. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 36, p. 24448-24459, 2008.

DALE, C. S. et al. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 431-436, 2005.

DAUCH, P.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Specific-inhibition of endopeptidase-24.16 by dipeptides. **Eur. J. Biochem.**, v. 202, n. 2, p. 269-276, 1991.

DAUCH, P.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Molecular cloning and expression of rat brain endopeptidase 3.4.24.16. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 45, p. 27266-27271, 1995.

DEFRONZO, R. A. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, n. 12, p. 1000-1007, 1981.

DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. S157-S163, 2009.

DODD, G. T. et al. The peptide hemopressin acts through cb1 cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 21, p. 7369-7376, 2010.

DOULUT, S. et al. Synthesis and analgesic effects of n-[3-[(hydroxyamino)carbonyl]-1-oxo-2(r)-benzylpropyl]-l-isoleucyl-l-leucine, a new potent inhibitor of multiple neurotensin neuromedin-n degrading enzymes. **J. Med. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 1369-1379, 1993.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. **Nature**, v. 185, p. 701-702, 1960.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell. Metab.**, v. 17, n. 2, p. 162-184, 2012.

FERRO, E. S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A. C. M. Intracellullar peptides as putative natural regulators of protein interactions. **J. Neurochem.**, v. 91, n. 4, p. 769-777, 2004.

FLYNN, J. M. et al. Myogenin regulates exercise capacity and skeletal muscle metabolism in the adult mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13535, 2010.

FONTENELE-NETO, J. D. et al. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (ec3.4.24.15) and 24.16 (ec3.4.24.16) in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 438, n. 4, p. 399-410, 2001.

FRICKER, L. D. Neuropeptidomics to study peptide processing in animal models of obesity. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4185-4190, 2007.

FRITAH, A. et al. Absence of rip140 reveals a pathway regulating glut4-dependent glucose uptake in oxidative skeletal muscle through ucp1-mediated activation of ampk. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32520, 2012.

GARRIDO, P. A. G. et al. Confocal microscopy reveals thimet oligopeptidase (ec 3.4.24.15) and neurolysin (ec 3.4.24.16) in the classical secretory pathway. **DNA Cell Biol.**, v. 18, n. 4, p. 323-331, 1999.

GELMAN, J. S. et al. Quantitative peptidomics to measure neuropeptide levels in animal models relevant to psychiatric disorders. **Methods Mol. Biol.**, v. 829, p. 487-503, 2012.

GOLLNICK, P. D. et al. Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. **J. Appl. Physiol.**, v. 33, n. 3, p. 312-319, 1972.

HANSON, R. W.; RESHEF, L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (gtp) gene expression. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 581-611, 1997.

HAYNES, C. M. et al. The matrix peptide exporter haf-1 signals a mitochondrial upr by activating the transcription factor zc376.7 in c. Elegans. **Mol. Cell.**, v. 37, n. 4, p. 529-540, 2010.

HEIMANN, A. S. et al. Ace gene titration in mice uncovers a new mechanism for ace on the control of body weight. **Physiol. Genom.**, v. 20, n. 2, p. 173-182, 2005.

HEIMANN, A. S. et al. Hemopressin is an inverse agonist of cb1 cannabinoid receptors. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.**, v. 104, n. 51, p. 20588-20593, 2007.

HERTZ, L. et al. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. **J. Neurosci. Res.**, v. 57, n. 4, p. 417-428, 1999.

HICKEY, M. S. et al. Skeletal-muscle fiber composition is related to adiposity and in-vitro glucose-transport rate in humans. **A. J. Physiol-Endoc M.**, v. 268, n. 3, p. E453-E457, 1995.

HIROTA, K.; FUKAMIZU, A. Transcriptional regulation of energy metabolism in the liver. **J. Recept. Signal. Transduct. Res.**, v. 30, n. 6, p. 403-409, 2010.

HOLT, L. J. et al. Grb10 regulates the development of fiber number in skeletal muscle. **FASEB J.**, v. 26, n. 9, p. 3658-3669, 2012.

HUTTON, J. C.; O'BRIEN, R. M. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 43, p. 29241-29245, 2009.

IZUMIYA, Y. et al. Fast/glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. **Cell Metab.**, v. 7, n. 2, p. 159-172, 2008.

JESKE, N. A. et al. Modulation of bradykinin signaling by ep24.15 and ep24.16 in cultured trigeminal ganglia. **J. Neurochem.**, v. 97, n. 1, p. 13-21, 2006.

JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **A. J. Physiol-Endoc M.**, v. 284, n. 4, p. E671-E678, 2003.

JITRAPAKDEE, S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 44, n. 1, p. 33-45, 2011.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating glut4 translocation and actin dynamics. **Endocr. J.**, v. 53, n. 3, p. 267-293, 2006.

KATO, A. et al. Targeting of endopeptidase 24.16 to different subcellular compartments by alternative promoter usage. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 24, p. 15313-15322, 1997.

KLOVER, P. J.; MOONEY, R. A. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 5, p. 753-8, 2004.

KONDO, T. et al. Small peptides switch the transcriptional activity of shavenbaby during drosophila embryogenesis. **Science**, v. 329, n. 5989, p. 336-339, 2010.

KONKOY, C. S.; DAVIS, T. P. Ectoenzymes as sites of peptide regulation. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, n. 8, p. 288-294, 1996.

KOO, S. H. et al. The creb coactivator torc2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. **Nature**, v. 437, n. 7062, p. 1109-1111, 2005.

KOOPMAN, R. et al. A single session of resistance exercise enhances insulin sensitivity for at least 24 h in healthy men. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 94, n. 1-2, p. 180-187, 2005.

KRAUSE, D. R. et al. Characterization and localization of mitochondrial oligopeptidase (mop) (ec 3.4.24.16) activity in the human cervical adenocarcinoma cell line hela. **J. Cell Biochem.**, v. 66, n. 3, p. 297-308, 1997.

LEE, A. D.; HANSEN, P. A.; HOLLOSZY, J. O. Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. **FEBS Lett.**, v. 361, n. 1, p. 51-54, 1995.

LYONS, P. J.; FRICKER, L. D. Peptidomic approaches to study proteolytic activity. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, v. Chapter 18, p. Unit18 13, 2011.

MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 807-812, 2001.

MARGUET, D. et al. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking cd26. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 12, p. 6874-6879, 2000.

MASSARELLI, E. E. et al. Differential subcellular distribution of neurolysin (ec 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (ec 3.4.24.15) in the rat brain. **Brain Res.**, v. 851, n. 1-2, p. 261-265, 1999.

MAYR, B.; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, n. 8, p. 599-609, 2001.

MEST, H. J.; MENTLEIN, R. Dipeptidyl peptidase inhibitors as new drugs for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 48, n. 4, p. 616-620, 2005.

NADER, G. A.; ESSER, K. A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 90, n. 5, p. 1936-1942, 2001.

NAGGERT, J. K. et al. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase e mutation which reduces enzyme activity. **Nat. Genet.**, v. 10, n. 2, p. 135-142, 1995.

NG, Y. et al. Rapid activation of akt2 is sufficient to stimulate glut4 translocation in 3t3-l1 adipocytes. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 4, p. 348-356, 2008.

NORMAN, M. U. et al. Regulation of cardiovascular signaling by kinins and products of similar converting enzyme systems - endopeptidases 3.4.24.15 and 24.16 in endothelial cells: Potential role in vasoactive peptide metabolism. **Am. J. Physiol-Heart C.**, v. 284, n. 6, p. H1978-H1984, 2003.

O'BRIEN, R. M.; GRANNER, D. K. Regulation of gene expression by insulin. **Biochem. J.**, v. 278 (Pt 3), p. 609-619, 1991.

OLIVEIRA, E. B.; MARTINS, A. R.; CAMARGO, A. C. Isolation of brain endopeptidases: Influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. **Biochemistry**, v. 15, n. 9, p. 1967-1974, 1976.

OLIVEIRA, E. B. et al. Carboxypeptidase b and other kininases of the rat coronary and mesenteric arterial bed perfusates. **Am. J. Physiol-Heart C.**, v. 293, n. 6, p. H3550-3557, 2007.

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, T. G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **Eur. J. Biochem.**, v. 135, n. 1, p. 81-88, 1983.

PASCHOALIN, T. et al. Characterization of thimet oligopeptidase and neurolysin activities in b16f10-nex2 tumor cells and their involvement in angiogenesis and tumor growth. **Mol. Cancer**, v. 6, 2007.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc. Res. Tech.**, v. 50, n. 6, p. 500-509, 2000.

PILIPONSKY, A. M. et al. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. **Nat. Med.**, v. 14, n. 4, p. 392-398, 2008.

POMMERY, N.; HENICHART, J. P. Involvement of pi3k/akt pathway in prostate cancer - potential strategies for developing targeted therapies. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 5, n. 12, p. 1125-1132, 2005.

PRADA, P. O. et al. Western diet modulates insulin signaling, c-jun n-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576-1587, 2005.

RASHID, M. et al. Functional up-regulation of endopeptidase neurolysin during post-acute and early recovery phases of experimental stroke in mouse brain. **J. Neurochem.**, 2013.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. In: BARRETT, A. J. et al. (Ed.) **Proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases**. Orlando: Academic Press, 1995. v. 248, p. 183-228.

RAY, K. et al. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 19, p. 20480-20489, 2004.

RAY, K.; HINES, C. S.; RODGERS, D. W. Mapping sequence differences between thimet oligopeptidase and neurolysin implicates key residues in substrate recognition. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2237-2246, 2002.

RESHEF, L. et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 33, p. 30413-30406, 2003.

RIBEIRO, N. M. et al. Agh is a new hemoglobin alpha-chain fragment with antinociceptive activity. **Peptides**, v. 48, p. 10-20, 2013.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, glut4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiol. Rev.**, v. 93, n. 3, p. 993-1017, 2013.

RIOLI, V. et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 10, p. 8547-8555, 2003.

RIOLI, V. et al. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: Comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. **Biochem. Biophys. Res. Co.**, v. 250, n. 1, p. 5-11, 1998.

RUSSO, L. C. et al. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3epsilon and calmodulin. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2641-2655, 2012a.

RUSSO, L. C. et al. Inhibition of thimet oligopeptidase by sirna alters specific intracellular peptides and potentiates isoproterenol signal transduction. **FEBS Lett.**, v. 586, n. 19, p. 3287-3292, 2012b.

RYDER, J. W. et al. Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from glut4-deficient mice. **FASEB J.**, v. 13, n. 15, p. 2246-2256, 1999.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SARABU, R.; GRIMSBY, J. Targeting glucokinase activation for the treatment of type 2 diabetes--a status review. **Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.**, v. 8, n. 5, p. 631-637, 2005.

SARIC, T.; GRAEF, C. I.; GOLDBERG, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 45, p. 46723-46732, 2004.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiol. Rev.**, v. 76, n. 2, p. 371-423, 1996.

SHRIMPTON, C. N.; SMITH, A. I.; LEW, R. A. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. **Endocr. Rev.**, v. 23, n. 5, p. 647-664, 2002.

SMITH, A. I. et al. A novel stable inhibitor of endopeptidases ec 3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. **Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 626-630, 2000.

TAGORE, D. M. et al. Peptidase substrates via global peptide profiling. **Nat. Chem. Biol.**, v. 5, n. 1, p. 23-25, 2009.

TAN, S. X.; NG, Y.; JAMES, D. E. Akt inhibitors reduce glucose uptake independently of their effects on akt. **Biochem. J.**, v. 432, p. 191-197, 2010.

TANNER, C. J. et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **A. J. Physiol-Endoc M.**, v. 282, n. 6, p. E1191-E1196, 2002.

THIEBAUD, D. et al. The effect of graded doses of insulin on total glucose-uptake, glucose-oxidation, and glucose storage in man. **Diabetes**, v. 31, n. 11, p. 957-963, 1982.

TIAN, R. Another role for the celebrity akt and insulin resistance. **Circ. Res.**, v. 96, n. 2, p. 139-140, 2005.

VAN SCHAFTINGEN, E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. **Eur. J. Biochem.**, v. 179, n. 1, p. 179-184, 1989.

VILLHAUER, E. B. et al. 1-[[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(s)-pyrrolidine: A potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase iv inhibitor with antihyperglycemic properties. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 13, p. 2774-2789, 2003.

VINCENT, B. et al. Distinct properties of neuronal and astrocytic endopeptidase 3.4.24.16: a study on differentiation, subcellular distribution, and secretion processes. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 16, p. 5049-5059, 1996.

VINCENT, B. et al. Phosphorus-containing peptides as mixed inhibitors of endopeptidase-3.4.24.15 and endopeptidase-3.4.24.16 - effect on neurotensin degradation in-vitro and in-vivo. **Bri. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 6, p. 1053-1063, 1995.

VINCENT, B. et al. Effect of a novel selective and potent phosphinic peptide inhibitor of endopeptidase 3.4.24.16 on neurotensin-induced analgesia and neuronal inactivation. **Bri. J. Pharmacol.**, v. 121, n. 4, p. 705-710, 1997.

WANG, Y. X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by ppar delta (vol 2, pg e61, 2004). **Plos Biology**, v. 3, n. 1, p. 177-177, 2005.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and glut4 translocation. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 175-193, 2001.

WILLIAMSON, D. L. et al. Reduction in hybrid single muscle fiber proportions with resistance training in humans. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 5, p. 1955-1961, 2001.

ZISSER, H. et al. Exercise and diabetes. **Int. J. Clin. Prac.**, v. 65, p. 71-75, 2011.

ZURLO, F. et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. **J. Clin. Invest.**, v. 86, n. 5, p. 1423-1427, 1990.