RENNAN DE OLIVEIRA CAMINHOTTO

BLOQUEADORES FARMACOLÓGICOS DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE ADIPÓCITOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

RENNAN DE OLIVEIRA CAMINHOTTO

BLOQUEADORES FARMACOLÓGICOS DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE ADIPÓCITOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fabio Bessa Lima

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 não autorizada pelo autor

Caminhotto, Rennan de Oliveira.
Bloqueadores farmacológicos do sistema renina-angiotensina e a regulação do metabolismo de adipócitos isolados / Rennan de Oliveira Caminhotto. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Bessa Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do tecido adiposo.

Versão do título para o inglês: Pharmacological blockers of the renin-angiotensin system and the regulation of the metabolism in isolated fat cells.

1. Biologia 2. Fisiologia 3. Metabolismo 4. Metabolismo celular 5. Metabolismo de carboidratos 6. Metabolismo de gorduras I. Lima, Prof. Dr. Fabio Bessa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB052/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rennan de Oliveira Caminhotto.

Título da Dissertação: Bloqueadores farmacológicos do sistema renina-angiotensina e a regulação do metabolismo de adipócitos isolados.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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 **022** nas fls. **125** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Fabio Bessa Lima**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Sistema renina-angiotensina e os mecanismos de regulação da lipólise"* do qual participam o(s) **Rennan de Oliveira Caminhotto, Ana Carolina Leão da Silva, André Ricardo Gomes de Proença, Amanda Baron Campaña, Rogério Antonio Laurato Sertié,** 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 **16 .05.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 21 de maio de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

A meus Pais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Fabio pela oportunidade de ser seu aluno desde a iniciação científica.

Agradeço a Sandra Andreotti por todo o cuidado e dedicação.

Agradeço a todos meus colegas de pós-graduação, em especial André Proença, Amanda Campaña, Rogério Sertié e Natalie de Castro que, além de toda ajuda, contribuíram muito para minha formação acadêmica desde a iniciação científica.

Agradeço todos os funcionários do ICB que pelo seu bom trabalho permitiram e auxiliaram a realização do meu.

Também agradeço ao apoio financeiro e concessão de bolsa da FAPESP e CAPES durante a pós-graduação e iniciação científica.

Por fim e com maior importância, agradeço meus Pais por toda a dedicação, paciência e amor, assim como, pelos mesmos motivos, a Camila Celada, minha futura esposa.

RESUMO

Caminhotto RO. Bloqueadores farmacológicos do sistema renina-angiotensina e a regulação do metabolismo de adipócitos isolados. [dissertação (mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O sistema renina-angiotensina (SRA) é longamente reconhecido como um importante regulador da pressão arterial sistêmica e da homeostase hidroeletrolítica e seus bloqueadores farmacológicos são importantes ferramentas para o tratamento da hipertensão. Porém, dados recentes apontam para a participação do SRA em processos metabólicos, devido a sua presença local em tecidos metabolicamente ativos, como o tecido adiposo, e sugerem que tais tecidos também poderiam ser alvos dos bloqueadores do SRA. Por isso, investigamos possíveis efeitos diretos de bloqueadores do SRA no metabolismo celular de adipócitos isolados. Para isso, adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal de ratos Wistar foram tratados com doses não tóxicas de inibidores de renina (Alisquireno) ou ECA (Captopril) ou um antagonista do receptor AT1 (Losartan). Após 24 horas, as capacidades lipolíticas, lipogênicas e oxidativas foram estudadas em seus respectivos estados espontâneo e estimulado. Ainda, a expressão gênica de PPARγ, e de componentes do SRA, também foi avaliada. Como resultados, o fármaco Alisquireno, aumentou a relação entre oxidação de glicose e incorporação desse substrato em lipídeos frente a estimulo de insulina, enquanto o Captopril diminuiu a incorporação de glicose em lipídeos, particularmente na fração glicerol do TAG mediante estímulo com insulina, bem como diminuiu a expressão gênica de receptor de (pró) renina. Por fim, nenhum dos fármacos foi capaz de alterar a capacidade lipolítica estimulada pelo agonismo β-adrenérgico, expressão gênica dos outros componentes do SRA estudados e do fator de transcrição PPARγ. Como conclusão, os fármacos Captopril e Alisquireno podem modular o metabolismo lipogênico e oxidativo de adipócitos isolados, mas de maneiras diferentes.

Palavras-chave: Adipócitos. Sistema Renina-Angiotensina. Lipogênese. Lipólise. Glicose

ABSTRACT

Caminhotto RO. Pharmacological blockers of the renin-angiotensin system and the regulation of the metabolism in isolated fat cells. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The renina-angiotensin system (RAS) have been well recognized as an important regulatory mechanism of blood pressure and hydroelectrolytic homeostasis while its pharmacological blockers are significant tools in the treatment of hypertension. However, recent data indicate a RAS participation in metabolic process, due its local presence in tissues, like the adipose tissue, and suggests that these tissues could be targets of RAS blockers. Therefore, we have studied the possible effects of pharmacological RAS blockers in isolated fat cells. Therefore, fat cells were isolated of epididymal fat pad and treated with non toxic doses of renin inhibitor (Aliskiren) or ACE inhibitor (Captopril) or AT1 receptors blocker (Losartan). After 24 hours, the lipolytic, lipogenic and oxidative capacity were tested in their respective spontaneous and stimulated states. Also, gene expression of PPARγ and RAS components were verified. The results showed Aliskiren increases the relation between oxidation and lipogenesis from glucose, whereas Captopril decreased glucose lipid incorporation, especially in glicerol fraction of triglyceride when insulin stimulus exists. Renin receptor gene expression was decreased by Captopril, while no more alterations happened in other RAS components or PPARγ with any treatment. As a conclusion, Captopril and Aliskiren can directly modulate lipogenic and oxidative metabolism of isolated fat cells, but in a different way.

Keywords: Fat cells. Renin-angiotensin system. Lipogenesis. Lipolysis. Glucose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
1.1 Sistema Renina-Angiotensina 10
1.2 Metabolismo de adipócitos 12
1.3 Sistema renina-angiotensina e tecido adiposo branco 14
1.4 Bloqueadores do sistema renina-angiotensina e células adiposas 16
2 OBJETIVOS 18
2.1 Objetivos Específicos 18
3 MÉTODOS 19
3.1 Isolamento dos Adipócitos e Análise Morfométrica 19
3.2 Teste de viabilidade celular (XTT ensaio colorimétrico) 20
3.3 Incubação de adipócitos isolados com os fármacos 20
3.4 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol 21
3.5 Teste de Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em Lipídeos e produção de $^{14}CO_2$ 21
3.6 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase 22
3.6.1 Extração de RNA total 22
3.6.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa 23
3.6.3 PCR quantitativo (real time) 24
3.6.4 Quantificação relativa – Método de CT comparativo (ΔΔCT) 25
3.7 Análise estatística 26
4 RESULTADOS 27
4.1 Teste de viabilidade celular 27
4.2 Avaliação da capacidade lipolítica de adipócitos isolados 28
4.3 Avaliação do metabolismo de adipócitos a partir de glicose –Oxidação e lipogênese 30
4.3.1 Relação entre oxidação e incorporação de glicose em lipídeos 35
4.4 Avaliação da expressão gênica 37
4.4.1 Genes Padronizados 37
4.4.2 Comentário sobre expressão gênica de Renina, Receptores AT2 e MAS e Cyp11b2 39
5 DISCUSSÃO 40
6 CONCLUSÕES 48
REFERÊNCIAS 49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina-Angiotensina

A história do sistema renina-angiotensina se inicia em 1898, com a descoberta da renina em estudos realizados no Instituto Karolinska, na Suécia, por Robert Tigerstedt e seu estudante, Per Bergman. Os trabalhos de Richard Bright (1789-1858) e Charles Brown-Sequard (1817-1894) foram as principais influências de Tigerstedt. Bright foi o primeiro a demonstrar, através da observação de pacientes, correlação entre doença renal e hipertensão. Por sua vez Brown-Sequard, o pai da endocrinologia moderna, foi autor da teoria de que muitos órgãos secretavam substâncias ativas na circulação e iniciou pesquisas com extratos de tecidos. Tendo em vista a conexão íntima entre as doenças renais e cardíacas e o advento da endocrinologia moderna, lhe pareceu possível investigar a presença de uma possível substância derivada dos rins que poderia influenciar o sistema circulatório (Basso, Terragno, 2001; Marks, Maxwell, 1979).

Com a hipótese formada, Tigerstedt e Bergman (1898) demonstraram efeitos pressóricos de uma substância encontrada em extratos renais, e denominaram essa substancia de renina. Entretanto, essa descoberta passou despercebida até que em 1934, quando Harry Goldblatt criou a clássica metodologia de hipertensão experimental renovascular em cães, através de pinçamentos das artérias renais. Em anos seguintes, por volta de 1936, simultâneas pesquisas realizadas na Escola de Medicina de Buenos Aires e nos laboratórios de Eli Lilly, em Indinapolis, descreveram a presença de um novo componente no sangue venoso de rins sob isquemia. Após extração do sangue, foi demonstrado que o novo agente possuía um efeito constritor passageiro. A conclusão final foi que a renina agia enzimaticamente em uma proteína plasmática e produzia a nova substância. Em Buenos Aires ela foi chamada de hipertensina e nos Estados Unidos, angiotonina. Em 1958, após acordo entre os pesquisadores, a substância foi chamada de angiotensina (Basso, Terragno, 2001; Marks, Maxwell, 1979).

A enzima renina possui o aparelho justa glomerular renal como seu principal local de síntese. Ela é secretada através de estímulos locais e sistêmicos, como diminuição da carga de sódio na mácula densa e aumento da atividade simpática renal. Na circulação, ela metaboliza seu único substrato, o angiotensinogênio (AGT),

encontrado, sobretudo no plasma, e o converte a um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I). Posteriormente, a ANG I é convertida em um octapeptídeo, chamado de ANG II, pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) que está presente principalmente em células endoteliais, mas também na circulação sistêmica. Apesar de atualmente não haver efeitos biológicos descritos da ANG I, a ANG II tem importantes ações demonstradas. Através de receptores de membrana acoplados a proteínas G, denominados AT1 e 2, a ANG II provoca aumento da pressão e volume vascular por estimular vasoconstrição, remodelação vascular, retenção de sódio, sede e síntese e secreção de aldosterona pelo córtex da adrenal (Bader, 2010).

No início da última década, foi identificada uma enzima homóloga à ECA, a ECA 2. Esta, também é expressa em endotélios e pode ser secretada na circulação. Em contraste com a ECA, a ECA 2 apresenta maior seletividade quanto ao seus locais de síntese, sendo em humanos expressa principalmente em coração, rins e testículos. Em sua ação enzimática, a ANG I é convertida em ANG 1-9, que pode ser convertida em ANG 1-7 pela ação da ECA. Também, a ECA 2 pode agir em ANG II, convertendo-a em ANG 1-7. Dessa forma, em geral, a maior atividade da ECA 2 estimula a geração de ANG 1-7 (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000).

A ANG 1-7 é um ligante endógeno do receptor MAS. O receptor MAS é acoplado a proteínas G e até pouco tempo era considerado um receptor “órfão”. Acredita-se que a ANG1-7 e seu receptor MAS sejam antagonistas fisiológicos da ANG II e seus receptores AT1, sendo um alvo promissor para intervenções farmacológicas (Kostenis et al., 2005; Santos et al., 2003).

Nesse sentido, bloqueadores farmacológicos do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) são utilizados de forma clássica no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. A esta classe de fármacos pertencem os inibidores de ECA (como captopril, enalapril, lisinopril, etc), os antagonistas de receptores AT1 (como losartan, candesartan, valsartan, etc) e mais recentemente os inibidores de renina, que tiveram sua primeira aprovação pela FDA em 2007, com o Hemifumarato de Alisquireno, único exemplar disponível no mercado (Bader, 2010; Jesen et al., 2008).

Contudo, não apenas benefícios na pressão arterial foram encontrados com o bloqueio farmacológico do SRA, mas também melhora de aspectos metabólicos.

Já foi demonstrado, por exemplo, que tanto inibidores de ECA quanto a administração de Alisquireno são eficazes em limitar o ganho de adiposidade e melhorar o quadro de resistência à insulina sistêmica em modelos de obesidade e

diabetes tipo II (Iwai et al., 2010; Kloet et al., 2009; Oh et al., 2012; Santos et al., 2009; Stucchi et al., 2009). Bloqueadores do receptor AT1 e ECA do mesmo modo proporcionaram uma melhora de sensibilidade à insulina sistêmica acompanhada da diminuição do volume dos adipócitos (Furuhashi et al., 2004). Algumas evidências apontam para ações diretas destes fármacos em tecidos metabolicamente ativos, como músculo, fígado e tecido adiposo, melhorando captação de glicose e sinalização de insulina (Carvalho et al., 1997; Carvalho et al., 1998; Fujimoto et al., 2004; Moises et al., 2003). Além disso, alterações em mecanismos de regulação dos principais eventos metabólicos de adipócitos já foram demonstradas com o tratamento com inibidores de ECA em animais (Oh et al., 2012; Santos et al., 2009).

1.2 Metabolismo de adipócitos

Os triacilgliceróis (TAG) são, quantitativamente, a forma de armazenamento mais importante de energia para as células eucarióticas (Cases, *et al.,* 1998), uma vez que sua completa oxidação gera mais que o dobro de energia do que o mesma quantidade de carboidratos e proteínas. Além disso, eles não precisam de água como solvente, sendo depositados no citoplasma celular em gotículas lipídicas–que não apresentam nenhum efeito sobre a osmolaridade citoplasmática (Turkish e Sturley, 2008).

Nesse contexto metabólico, os adipócitos possuem marcante contribuição por sua capacidade em armazenar TAG em gotas lipídicas especializadas e a gordura corporal é um resultado entre o balanço de deposição e remoção do TAG no tecido adiposo (Langin, 2011).

O aumento simultâneo de insulina, glicose e lipídios durante as refeições estimulam a formação de TAG em células adiposas (Ahima, 2006). A formação de TAG é denominada de lipogênese e compreende a biossíntese, a incorporação e o armazenamento do TAG. A formação de TAG ocorre pela esterificação de ácidos graxos a moléculas de glicerol-3-fosfato. Apesar do conceito simples, considerações devem ser feitas a cerca das fontes desses substratos.

Em seres humanos, a principal fonte de ácidos graxos são os quilomícrons, de origem intestinal, e as VLDL, lipoproteínas hepáticas ricas em TAG. Os adipócitos expressam uma enzima chamada de lípase de lipoproteínas, capaz de hidrolisar o TAG presente nessas lipoproteínas circulantes. Após sua síntese, a lipase de

lipoproteínas é secretada para o interstício circundante e transportada até a face luminal das células endoteliais dos capilares, onde encontra seu substrato nas lipoproteínas plasmáticas (Davies et al., 2012).

Apesar disso, as células adiposas, também podem sintetizar ácidos graxos, principalmente em roedores, que ingerem a maior parte de sua energia sob a forma de carboidratos. A processo é chamado de síntese *de novo* de ácidos graxos. As reações para síntese *de novo* de ácidos graxos são catalisadas no citoplasma pelas enzimas acetil-CoA carboxilase e pelo complexo ácido graxo sintetase (FAS). Sob condições lipogênicas, o excesso de glicose é convertido em piruvato pela glicólise. O piruvato é convertido em acetil-coenzima A e pode ser transportado como citrato da mitocôndria para o citoplasma. Neste passo, a molécula de citrato pode sofrer a ação de duas enzimas. A ATP citrato-liase que reconverte o citrato em acetil-CoA e oxalacetato. A outra enzima é a já citada acetil-CoA carboxilase, que catalisa a carboxilação de acetil-CoA, que se converte em malonil-CoA em uma via independente de ATP. Por sua vez, as moléculas resultantes das reações acima, acetil-CoA e malonil-CoA, são utilizadas como substratos para produção de palmitato por sete reações enzimáticas catalisadas pela FAS. Para isso, a FAS utiliza NADPH como agente redutor na síntese de palmitato, geralmente gerado pela enzima málica e via das pentoses (Sul, Wang, 1998).

Assim que captados ou produzidos, os ácidos graxos são incorporados em TAG. A esterificação em glicerol-3-fosfato ocorre através de várias reações enzimáticas, onde destacamos a enzima glicerol 3-fosfato aciltransferase, que possui sua atividade modulada de forma concordante com a regulação da síntese de TAG e estimulação por insulina (Vila et al., 1990; Wendel et al., 2009).

Por sua vez, o glicerol-3-fosfato, por premissa, não pode ser formado apenas pela fosforilação de glicerol no tecido adiposo branco, uma vez que possui baixa atividade da enzima glicerol quinase. Por isso, ele deve ser gerado através glicose, ou mesmo de outros substratos não glicídicos, como lactato, piruvato e aminoácidos, através da gliceroneogênese (Reshef et al., 2003).

A gliceroneogênese é descrita como via dominante na síntese *in vivo* de glicerol-3-fosfato no tecido adiposo de ratos, mesmo quando o substrato energético original é a glicose, que tende a avançar na via glicolítica e ciclo de Krebs até ser convertida em oxaloacetato que retorna da matriz mitocondrial e é convertido em fosfoenolpiruvato, pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK),

que passa a seguir o sentido inverso da glicólise devido a enzimas que catalisam reações reversíveis para gerar di-hidroxiacetona-fosfato que é convertido em glicerol-3-fosfato pela ação da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH) (Nye et al., 2008).

Uma vez armazenada, a gordura, sob a forma de TAG, pode ser mobilizada e suprir a demanda energética. Situações como a queda da concentração de insulina durante o jejum desencadeia a mobilização de TAG, pela ativação do sistema nervoso simpático e a elevação de hormônios como glucagon e, principalmente, as catecolaminas. Os ácidos graxos liberados do tecido adiposo são então oxidados pelo músculo e fígado, enquanto o resíduo glicerol pode ser convertido em glicose pelo fígado e auxiliar na manutenção da glicemia (Ahima, 2006; Langin, 2011).

A mobilização de AG das gotículas de TAG requer enzimas lipolíticas. O TAB, tanto em ratos como em humanos, expressa três principais enzimas que coordenadamente hidrolisam os TAG armazenados. São elas: a lipase de triglicerídeos de tecido adiposo que catalisa a etapa inicial na hidrólise de triglicerídeos e está relacionada à atividade lipolítica basal nos adipócitos; a lipase hormônio sensível (HSL) que catalisa a etapa limitante da lipólise uma vez estimulada hormonalmente por fosforilação; e a lipase de monoacilglicerol que promove a hidrólise do último ácido graxo (Langin et al., 2005; Zimmermann et al., 2004). As catecolaminas são os principais hormônios estimuladores da lipólise vias receptores β-adrenérgicos, enquanto que a insulina atua de forma inibitória no processo de lipólise de forma conjunta com à ativação de receptores α2-adrenérgicos que são antilipolíticos (Langin, 2006).

Adicionalmente, ambos os eventos metabólicos, lipogênese e lipólise, além de serem modulados por hormônios clássicos, também podem ser influenciados por adipocinas, como leptina, TNF-α, interleucinas (Ceddia et al.,1998; Galic et al., 2010; Hoene e Weigert, 2008; William et al.,2002), o que gera a oportunidade de discussão sobre um potencial efeito do SRA nesse contexto.

1.3 Sistema renina-angiotensina e tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco, mais especificamente, os seus adipócitos, são capazes de expressar todos os componentes do SRA, como angiotensinogênio, renina, ECA, receptores de angiotensina II (AT1 e AT2), bem como os componentes

da via não clássica do SRA, como a ECA 2, receptores MAS para ANG1-7 e receptores de (pro)renina. Isto suporta a ideia de que há um SRA local no TAB que tem ações parácrinas e autócrinas. Hoje, já é conhecido que o SRA local do tecido adiposo branco está envolvido em diversos mecanismos patológicos descritos na obesidade e na hipertensão. Portanto, este SRA local do tecido adiposo branco merece ser alvo de pesquisas e discussões detalhadas (Cassis, 2000; Engeli et al., 2000; Gupte et al., 2008; Karlsson et al., 1998).

Processos como o desenvolvimento e o metabolismo do tecido adiposo são regulados pelo SRA. A ANG II é capaz de inibir, via receptores AT1, a atividade lipolítica de adipócitos tanto em indivíduos eutróficos, quanto em obesos (Goossens et al., 2007). Ainda, a lipogênese é influenciada pela ANG II. O tratamento com ANG II em células 3T3-L1 aumenta a síntese de ácidos graxos e armazenamento de TAG, estimulando a transcrição e atividade de enzimas relacionadas a estas vias, como a ácido graxo sintase (FAS) e glicerol-3 fosfato desidrogenase (Jones et al., 1997). Portanto, receptores de angiotensina II (tanto AT1 quanto AT2) são capazes de modular a expansão de massa adiposa através de aumento da lipogênese (via AT 2) e diminuição da lipólise (via AT1). Assim, ambos os receptores possuem efeitos sinérgicos e aditivos para promoção do estoque lipídico em adipócitos (Yvan-Charvet, Quignard-Boulange, 2011). Também, foi descrito recentemente uma função estimulatória dos receptores MAS sobre os mecanismos de regulação da lipólise (Oh et al., 2012), e sua deleção foi associada à diminuição da captação de glicose pelos adipócitos e aumento da massa adiposa abdominal (Santos et al., 2008). Associado aos efeitos sobre o metabolismo descrito, a ANG II possui um efeito anti-adipogênico (Fuentes et al., 2010), o que facilita uma expansão de massa adiposa hipertrofiada, tendente a inflamação e resistência à insulina.

Ainda, em 2012 foi descrito que adipócitos maduros são capazes de produzir aldosterona, e que a secretam de modo basal e em resposta a ANG II. O mRNA da aldosterona sintase (CYP11B2), bem como a enzima já expressa, foram encontrados em adipócitos 3T3-L1 e adipócitos maduros de camundongos e humanos. A inibição de tal enzima em células 3T3-L1 diminuiu a expressão de PPARγ e aP2, importantes marcadores de adipogênese, demonstrando uma participação da aldosterona produzida localmente na diferenciação de adipócitos (Briones et al., 2012).

1.4 Bloqueadores do sistema renina-angiotensina e células adiposas

Devido à presença do SRA nos tecidos e sua descrita participação em processos tanto fisiológicos como patológicos (Whaley-Connell et al., 2010), se tem dado atenção a possíveis interações de fármacos bloqueadores do SRA e eventos que vão além da regulação da pressão arterial. A penetração tecidual de fármacos como o Alisquireno, principalmente no tecido adiposo (Boschmann et al., 2012), repercute de modo interessante, tornando razoáveis as hipóteses de que, através de tratamento farmacológico com bloqueadores do SRA, possam existir efeitos teciduais que não são completamente conhecidos.

No entanto, até então, pouco se tem estudado sobre efeitos diretos desses fármacos em células de gordura.

Alguns bloqueadores de receptores AT1 possuem a capacidade de estimular a adipogênese *in vitro* (Janke et al., 2002, 2006), enquanto o inibidor da ECA, Captopril, não possui efeitos significativos. Bloqueadores do SRA também possuem efeitos sobre a capacidade endócrina de células 3T3-L1, estimulando a secreção de apelina (Hung et al., 2011), um peptídeo vaso dilatador (Tatemoto et al., 2001). Da mesma forma, a secreção de adiponectina é aumentada com o tratamento de alguns bloqueadores do SRA, principalmente o temilsartan e, em menor extensão, Losartan, enquanto outros fármacos, como por exemplo, Captopril não possuem nenhum efeito modulatório (Brody et al., 2009). Tais efeitos ocorrem em geral devido a um agonismo parcial dos fármacos no fator de transcrição PPARγ, que desempenha papel chave na regulação do metabolismo, diferenciação e função endócrina de adipócitos (Nakagami et al., 2013).

Por sua vez, o tratamento com Captopril em células musculares BC3H-1 é capaz de modular a sensibilidade à insulina, aumentando a fosforilação das etapas de sinalização, assim como o transporte de glicose (Moisés et al., 2003).

No que diz respeito às capacidades metabólicas, alguns estudos celulares se resumem a demonstrar que o acúmulo de lipídeos em células em diferenciação tratadas com bloqueadores do SRA diminuem, assim como a produção de espécies reativas de oxigênio (Hung et al., 2011).

Portanto, a conhecida participação do SRA em doenças metabólicas e os benefícios metabólicos dos bloqueadores farmacológicos do SRA em quadros de indução de obesidade, resistência à insulina e hipertensão, assim como a

possibilidade de efeitos diretos desses fármacos em tecidos metabolicamente ativos, particularmente o tecido adiposo, são fundamentos que nos permitem investigar possíveis efeitos diretos de bloqueadores do SRA no metabolismo celular de adipócitos isolados. Como já foi demonstrada a presença do sistema renina-angiotensina e alguns efeitos diretos de fármacos em células adiposas, a nossa hipótese de trabalho é a de que os fármacos supramencionados afetarão capacidades metabólicas de adipócitos, de modo a influenciar uma menor deposição de lipídeos.

2 OBJETIVOS

Avaliar possíveis efeitos diretos de fármacos bloqueadores do SRA na regulação do metabolismo de adipócitos isolados.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos de bloqueadores de etapas distintas do SRA no metabolismo de adipócitos (capacidades lipolíticas, lipogênicas e oxidativas)

Investigar os efeitos de bloqueadores de etapas distintas do SRA na expressão de gênica de adipócitos, principalmente genes que participam do SRA, receptores do sistema calicreína-cinina, e PPARγ.

3 MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados ratos Wistar machos (7-9 semanas) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram acondicionados em caixas individuais de polipropileno (46x24x20cm), sob condições de temperatura ambiente controlada de 23±2 °C, ciclo de iluminação claro/escuro 12/12 (período claro iniciado às 7:00) e exaustão de amônia controlada. Água e alimentação foram fornecidas *ad libitum.*

Após uma semana de adaptação ao biotério, os animais foram eutanasiados por decapitação, após serem anestesiados com Tiopental (4 mg/100 mg de p.c.). A retirada do coxim adiposo periepididimal (PE) foi realizada mediante laparotomia mediana.

3.1 Isolamento dos Adipócitos e Análise Morfométrica

Os adipócitos do coxim PE foram isolados mediante a técnica de digestão de tecido pela colagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais. Em resumo, 1 g de tecido foi retirada, picada com tesoura em finos fragmentos incubados em 4,0 mL de tampão digestivo [D'MEM, HEPES 25 mM, BSA 4%, colagenase tipo II (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) 1,25 mg/mL, pH 7,45, por cerca de 60 min a 37 ^{o}C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EHB (sais de EARLE, HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) mantido a 37 ºC. Para a determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), aproximadamente 40 µL da suspensão celular em tampão EHB serão colocados em capilar de vidro e submetidos à centrifugação (1000 rpm por 1 min). O volume total da suspensão corresponde a 100% e o volume de adipócitos obtido após a centrifugação nos forneceu o lipócrito da amostra. Para análise morfométrica,

alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico (aumento de 100x) e os diâmetros celulares foram mensurados através de análise computadorizada realizada pelo programa Motic Image Plus 2.0. Para tal, foram medidas 50 células. A partir do diâmetro celular médio e admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume e o número de células foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

(a) $\mathbf{V} = [(\pi/6) \times \mathbf{D}^3]/1000$, (b) $\mathbf{N} = (\text{lipócrito} \times 10^7)/\mathbf{V}$,

onde: **D** é o diâmetro médio de 50 adipócitos (µm), **N** é o número de células e **V** é o volume médio (Di Girolamo et al., 1971). A divisão por 1000 em (a) visa expressar o volume em picolitros (pL).

3.2 Teste de viabilidade celular (XTT ensaio colorimétrico)

A viabilidade celular frente às concentrações de Alisquireno, Captopril e Losartan foi determinada pelo ensaio colorimétrico XTT de viabilidade celular (Cell Proliferation Kit II-XTT, Roche) de acordo com as instruções do fornecedor. Em suma, aproximadamente $0,35 \times 10^6$ células foram incubadas em placas de 6 wells com meio de cultura LGC (Low Glucose) a 5% de soro bovino fetal e 100 U de Penicilina e 100 µg de Estreptomicina, e tratadas, ou não, com Alisquireno (Rasilez, Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça) ou Captopril (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) ou Losartan (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) em doses de 1 µM ou 1 mM por 24 horas em estufa (5% de CO_2 e 37 ^oC) na presença da solução XTT. Após a reação, o produto resultante é o corante de formazan, que é diretamente proporcional à atividade mitocondrial de desidrogenases, e portanto, também da viabilidade celular. A concentração de formazan foi determinada através de umleitor de placas de Elisa, pela subtração da absorbância de 450 nm pela de 690 nm.

3.3 Incubação de adipócitos isolados com os fármacos

Adipócitos foram isolados do tecido PE para os ensaios de lipólise, lipogênese, oxidação e expressão gênica. Em seguida, aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células foram incubadas em garrafas de cultura (25 cm^2) com meio LGC (Low

Glucose) acrescido de 5% de soro bovino fetal e 100 U de Penicilina e 100 µg de Estreptomicina, e tratadas ou não, com Alisquireno (Novartis), Captopril (Sigma) ou Losartan (Sigma) em concentrações de 1 µM por 24 horas em estufa Forma Scientific *CO_2 water Jacketed Incubator* (5% de CO_2 e 37°C).

3.4 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol

Adipócitos isolados previamente tratados com os fármacos estudados (Alisquireno, Captopril, e Losartan) foram incubados em tampão Earle/Hepes 20 mM/BSA 1% com glicose 5 mM, pH 7,4 e tratadas por 30 min com adenosina (0.2 mM), cuja ação é inibir a atividade lipolítica via ativação de receptores acoplados a proteínas Gi. Em seguida, foi acrescentada uma mistura que continha adenosina deaminase (20 mU/mL), com o objetivo de eliminar a adenosina do meio e garantir a liberação da potencial resposta lipolítica, e uma curva de diferentes concentrações (0; 10^{-11} M; 10^{-10} M; 10^{-9} M; 5 x 10^{-9} M; 10^{-8} M; 10^{-7} M; 5 x 10^{-7} M; 10^{-6} M; 5 x 10^{-6} M) do agonista β-adrenérgico não seletivo Isoproterenol. No ponto basal, foi adicionado o veículo da curva dose resposta de Isoproterenol, o ácido ascórbico. O tempo de incubação foi de 30 min a 37°C. Ao final, a mistura de incubação (volume total= 200 ml) foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada a 4°C por 5 min a 7000 rpm. Alíquotas (120 mL) do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células (método enzimático-colorimétrico). Foram utilizados kits de Determinação de Glicerol Livre (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos). Procurando diminuir ainda mais qualquer influência nos resultados, foi feito uma incubação, a qual seguiu todos os procedimentos, exceto a adição de isoproterenol e a subsequente incubação da mistura por 30 min. O valor obtido nesta determinação foi considerado como liberação não específica de glicerol. Os resultados foram expressos em glicerol nmol. 10^6 células.

3.5 Teste de Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em Lipídeos e produção de $^{14}CO_2$

Adipócitos isolados previamente tratados com os fármacos estudados (Alisquireno, Captopril, e Losartan) foram incubados em tampão

Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1%/glicose 1mM em pH=7,4, a 37°C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, e foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo D-[U-^{14}C]-glicose (0,05 uCi/tubo) na ausência ou presença de diversas concentrações de insulina: 0,01 nM; 0,025 nM; 0,05 nM; 0,1 nM; 0,25 nM; 1 nM; 2,5 nM; 10 nM; 25 nM.

Os tubos foram vedados com tampa de borracha e a seguir, foram enriquecidos de uma atmosfera com 95% de O_2 5% de CO_2 e incubados por 120 minutos em banho-maria a 37 ^{o}C. Ao fim da incubação, foram adicionados 200 mL de H_2SO_4 e em seguida, tubos contendo um pedaço de papel filtro embebido em 200 µL de etanolamina foram emborcados aos tubos de reação, o conjunto foi selado com parafilme e mantido por 30 minutos a fim de adsorver o $^{14}CO_2$ liberado. O conjunto foi então desligado, e o tubo com papel foi preenchido com cocktail de cintilação (Universol, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA), e a radioatividade foi contada em beta-contador (Micro Beta Trilux, Perkin Elmer, EUA).

Na mistura restante, foi realizada a extração dos lipídios, mediante a adição de 2,5 mL de reativo de Dole (1955) (i.e. isopropanol:n-heptano:H_2SO_4 8N, 4:1:0.25) ao meio. Os tubos foram agitados e adicionaram-se 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada. Após a agitação em vórtex, deixou-se a mistura decantar e alíquotas de 0,5 mL da fase superior (contendo os lipídeos extraídos no n-heptano) foram transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLume^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada. Os resultados foram expressos em nmol.10^{6} células.

3.6 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase

3.6.1 Extração de RNA total

Após serem tratadas em cultura por 24 horas, as células adiposas isoladas foram homogeneizadas em Vórtex com trizol (Trizol Reagent®, Invitrogen, Life Technologies, PA, Estados Unidos), na proporção de 1 mL para cada 500 µL de células. A seguir, os homogenatos foram aliquotados (1 mL) e armazenados a -80 ºC para posterior extração.

Na etapa da extração, as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 20-25 ºC) para permitir a completa dissolução dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, 0,2 ml de clorofórmio foram adicionados aos tubos, agitando-se vigorosamente em vórtex, por 15 segundos, com posterior incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 1200 g por 15 minutos a 4 ºC, e ao final foram formadas 3 fases. A fase aquosa superior, contendo RNA, foi transferida para outro tubo e a purificação do RNA foi feita por coluna, seguindo o protocolo do kit manufaturado PureLink RNA Mini kit® (Cat. No. 12183-018A, Ambion by Life Technologies). O RNA total foi quantificado utilizando o equipamento Qubit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen) que utiliza a tecnologia fluorimétrica com corantes específicos para quantificar RNA. Estes corantes fluorescentes emitem sinais apenas quando ligado a molécula alvo específica, mesmo em baixas concentrações. Primeiramente, as amostras foram diluídas (1:100), bem como o Qubit® reagente (1:200), que foi diluído no Qubit tampão, gerando o Qubit solução de trabalho. Os padrões foram diluídos no Qubit solução de trabalho como manda o fabricante. Foram também pipetados 20 uL da amostra diluída com 180 uL de Qubit solução de trabalho em tubo ependorfe 0,5. Ambas as preparações foram agitadas em vórtex por 3 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Os tubos foram inseridos no aparelho Qubit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen) e procedeu-se às leituras. Por fim, foi utilizada a calculadora de diluições embutida no aparelho a fim de determinar as concentrações da amostra original.

3.6.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa

Na etapa inicial, foi pipetado em tubos 1 µg de RNA total e 1,82 µL de uma mistura contendo: 1 µL de tampão de DNAse (10x) e 1 µL da enzima DNAse (1 U/1 µL) e H_2O RNAse *Free* até completar um volume de 10 µL, além de $MgCl_2$ na concentração de 3,75mM. À amostra obtida (RNA + Mix de DNAse) foi adicionado H_2O RNAse *Free* até o volume de 20 µL. Após este procedimento, houve uma incubação a 37 ºC por 30 minutos (momento de ativação da enzima) seguidos por 10 minutos a 75 ºC (inativação). Isto foi feito com a finalidade de evitar uma possível amplificação de DNA genômico, que pode contaminar o RNA extraído. Na etapa seguinte (síntese de DNA), pipetou-se nos tubos contendo 20 µL de amostra tratada

com DNAse um segundo mix contendo tais reagentes nas seguintes proporções apresentadas na tabela 1:

Tabela 1. Proporção de reagentes durante transcrição reversa

Mix RT	**Volume em µL / amostra**
Tampão da enzima transcriptase reversa (5x)	10 uL
Ditiotreitol (DTT) 0.1 M	5 uL
dNTPmix - 2,5 mM/Base	10 uL
Random Primer (50 ng/uL)	2,5 uL
H_2O RNAse free	2 uL
Enzima transcriptase reversa (Superscript® III)	0,5 uL

Os tubos foram incubados a 25 ºC por 10 minutos, 50 ºC por 50 minutos e 70 ºC por 15 minutos. As incubações foram realizadas em termociclador (Eppendorf®, Hamburg, HH, Alemanha). O material obtido (cDNA [20 ng/µL]) foi então mantido em freezer a -20 ºC até a realização da próxima etapa – amplificação por PCR.

3.6.3 PCR quantitativo (real time)

Alíquotas de 2 µL de amostra de cDNA (40 ng) obtidas a partir da reação de RT foram adicionadas a um mistura contendo 2,65 µL de H_2O RNAse *Free*, 5 µL de TaqMan® Universal PCR *Master Mix* (Applied Biosystems, código do produto: 4304437, São Paulo, SP, Brasil), 0,35 µL de TaqMan® *Gene Expression Assay Mix* 20x (ver tabela 2) contendo os dois primers para PCR e uma sonda MGB TaqMan® marcada com FAM e um mix pré-formulado (20x), na concentração final 1x de 250 nM de sonda e 900 nM de cada *primer* (a tabela 1 mostra a lista dos kits inventariados utilizados com seus respectivos números de catálogo). As reações de PCR foram realizadas em aparelho Step One Plus® *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A reação de PCR iniciou-se com um período de 2 minutos para ativação da AmpErase® UNG seguida de 10 minutos a 95 ºC para a ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Essa fase só ocorre no primeiro ciclo de reação. As etapas seguintes envolvem desnaturação da fita de cDNA a temperatura de 95 ºC por 15 segundos, seguida da fase de anelamento do *primer* e extensão da fita por 1 minuto na temperatura de 60 ºC. Essas 2 fases se repetiram a cada ciclo por 40 ciclos. A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de CT comparativo ($\Delta\Delta C_T$).

3.6.4 Quantificação relativa – Método de CT comparativo (ΔΔCT)

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando um gene constitutivo como referência. A seguinte fórmula foi usada para calcular a quantidade relativa do gene alvo:

$$\Delta C_T = C_T(\text{alvo}) - C_T(\text{constitutivo})$$
$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{amostra}) - \Delta C_T(\text{controle})$$
$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Tabela 2. Lista de primers invetoriados (Applied Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assay)

Gene	Sigla de catálogo	Nº de catálogo
Beta-2 Microblobulina	B2m	Rn00560865_m1
Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ	Pparg	Rn00440945_m1
Receptor de (Pró)Renina	Atp6ap2	Rn01430718_m1
Renina	Ren	Rn00561847_m1
Angiotensinogenio	Agt	Rn01426719_m1
Enzima Conversora de Angiotensina	Ace	Rn00561094_m1
Enzima Conversora de Angiotensina 2	Ace 2	Rn01416293_m1
Receptor tipo 1 de Angiotensina II	Agtr1a	Rn02758772_s1
Receptor tipo 2 de Angiotensina II	Agtr2	Rn00560677_s1
Receptor Mas	Mas1	Rn00562673_s1
Receptor de Bradicina B1	Bdkrb1	Rn02064589_s1
Receptor de Bradicina B2	Bdkrb2	Rn00597384_m1
Aldosterona Sintase	Cyp11b2	Rn01767818_g1

Fonte: http://www.appliedbiosystems.com

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas utilizadas foram os testes de variânca One-way ANOVA ou Two-way quando especificado. O nível de significância prefixado foi de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de viabilidade celular

A figura 1 mostra como diferentes concentrações dos fármacos utilizados afetam a viabilidade celular de adipócitos isolados em nosso protocolo experimental. Nas figuras A, B e C, vemos que a concentração de 1 mM de Alisquireno, Captopril e Losartan, respectivamente, diminuem a viabilidade células medida pela formação de formazan. Ao contrário, na dose de 1 µM, os fármacos não apresentaram nenhum grau de toxicidade.

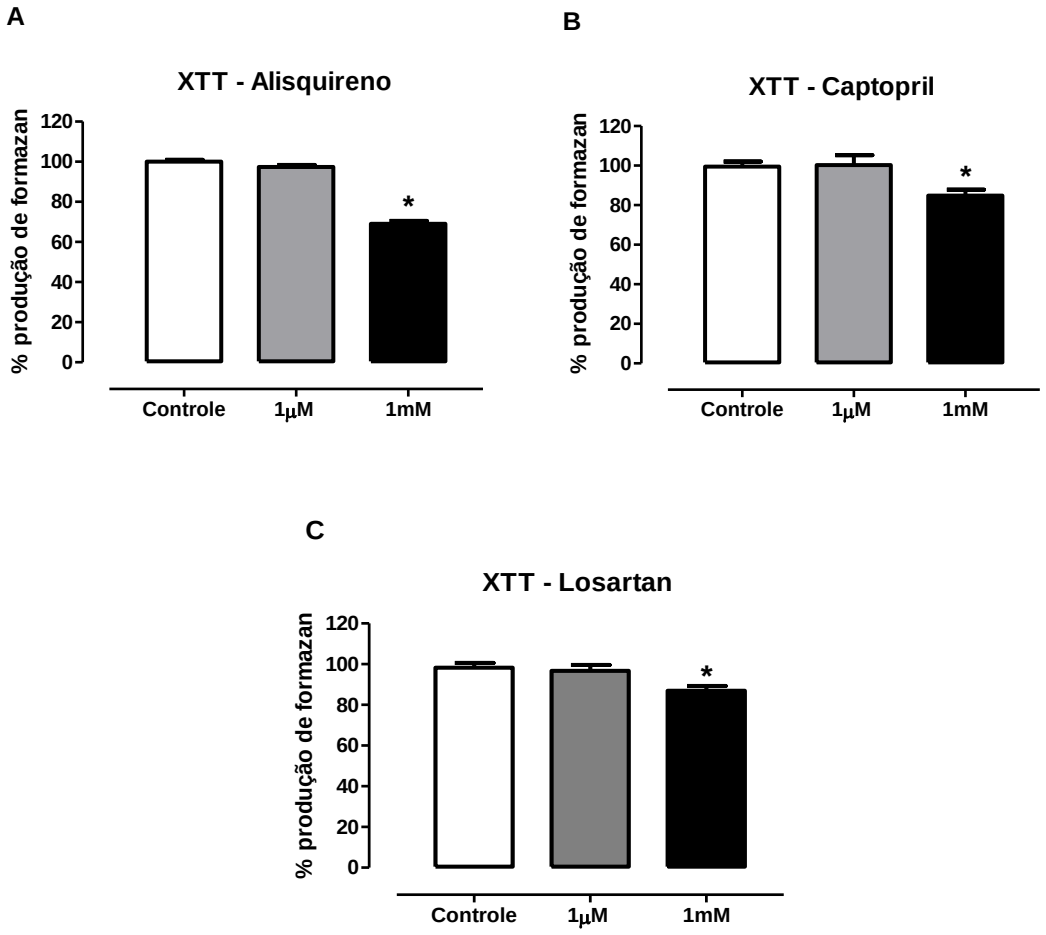

Figura 1. XTT – Ensaio de Viabilidade Celular. Porcentagem de produção de formazan foi estimada em células adiposas isoladas e incubadas com 1 µM ou 1mM de Alisquireno (A) , Captopril (B) e Losartan (C) por 24 horas. As barras representam médias + EPM dos grupos (n=6-9). ***P*< 0,05 vs. Controle e 1 µM (One-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

4.2 Avaliação da capacidade lipolítica de adipócitos isolados

As figuras 2 e 3 apresentam a capacidade em realizar lipólise medida pela liberação de glicerol de adipócitos isolados tratados com diferentes fármacos bloqueadores do SRA. Podemos constatar que o tratamento por 24 horas na dose de 1 µM não proporcionou mudanças nessa resposta metabólica. Na figura 4 podemos verificar em gráficos de barra, os pontos espontâneos, i.e. sem estímulo, e máximo, i.e. ponto de maior liberação de glicerol frente ao estímulo por isoproterenol. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, houve diferença P<0,05 para estímulo com isoproterenol (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni) em relação à resposta basal.

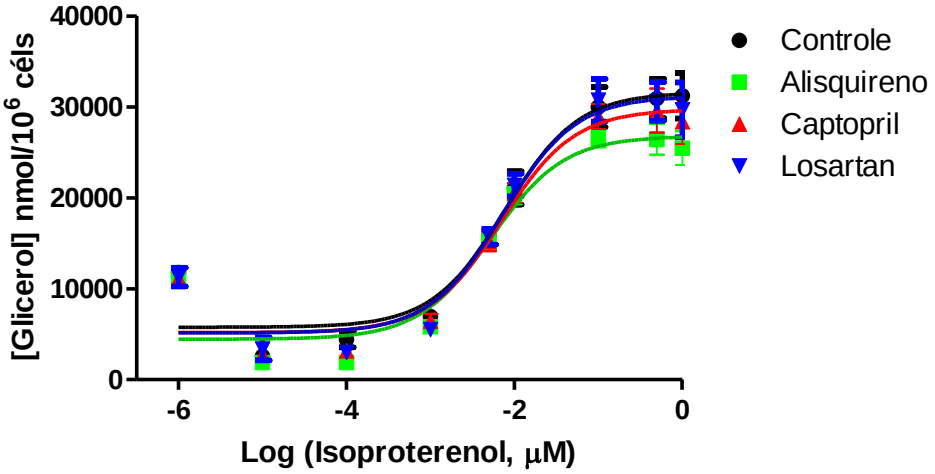

Figura 2. Curva dose-resposta ao agonismo β-adrenérgico. Efeito de diferentes concentrações de isoproterenol na taxa de lipólise de adipócitos isolados, previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. (n=6).

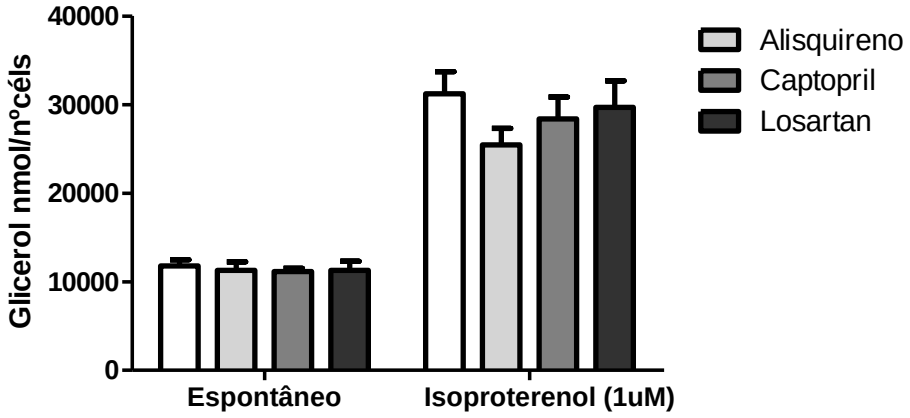

Figura 3. Capacidade de lipólise em adipócitos isolados. Comparação de liberação de glicerol em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). Não houve diferença entre os tratamentos. Entretanto, houve diferença $P<0,05$ para estímulo com isoproterenol (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

4.3 Avaliação do metabolismo de adipócitos a partir de glicose –Oxidação e lipogênese

No experimento, adipócitos isolados foram testados diante de sua capacidade de oxidação (figura 4) e incorporação de D-[U-14C]-glicose em lipídios (figura 5), glicerol (figura 6), e ácidos graxos (figura 7), frente uma curva dose resposta de insulina.

Na figura 4 percebemos características diferentes na taxa de oxidação de glicose diante de alguns tratamentos, enquanto as figuras 5 e 6 demonstram características distintas de incorporação de glicose em lipídeos totais e glicerol, enquanto a figura 7 não demonstra diferença significativa induzida pelos fármacos.

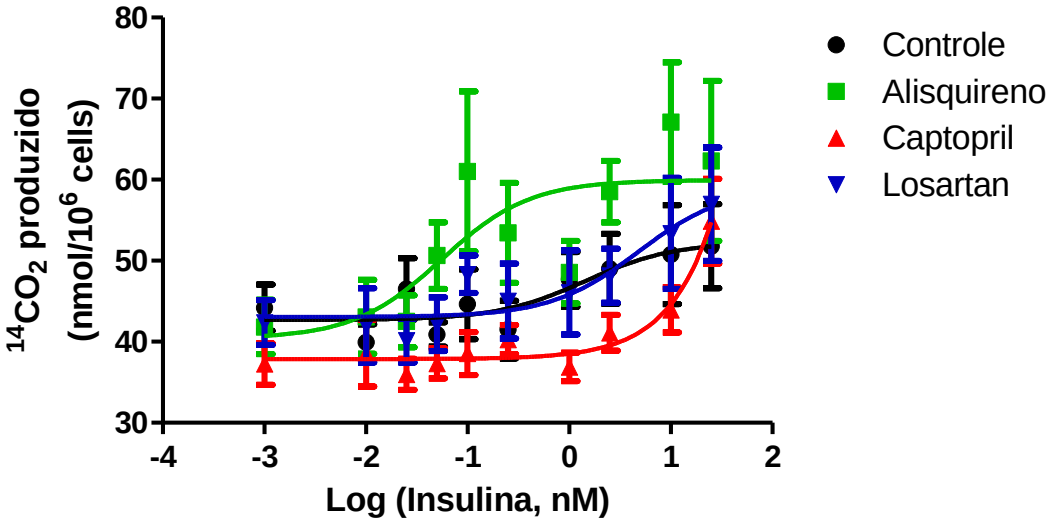

Figura 4. Curva dose resposta de oxidação de glicose em adipócitos isolados. Comparação de produção de $^{14}CO_2$ a partir de D-[U ^{14}C]-glicose em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. Os pontos representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). P<0,05 para variável tratamento. Ainda, P<0,05 para estímulo com insulina (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

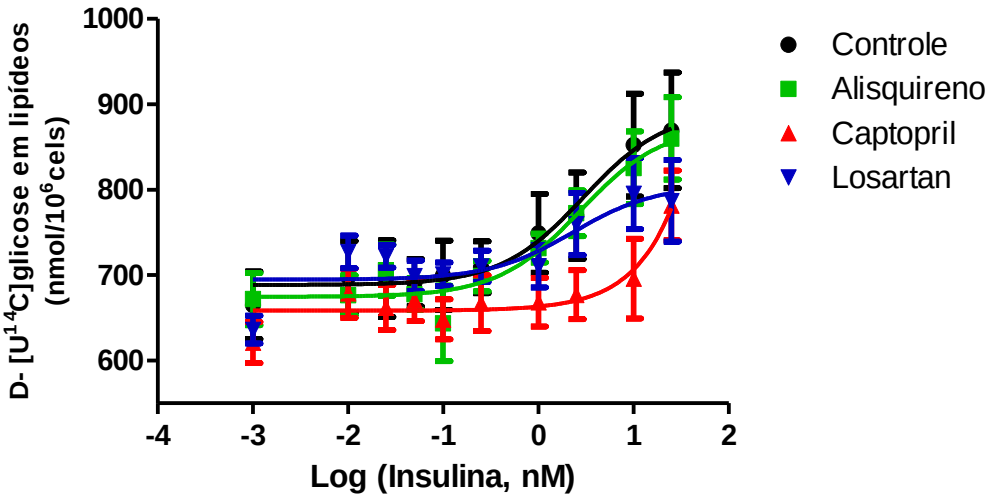

Figura 5. Curva dose resposta de incorporação de glicose em lipídeos de adipócitos isolados. Comparação da curva dose resposta à insulina na incorporação de D-[U ^{14}C]-glicose em triacilglicerol de adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. Os pontos representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). P<0,05 para variável tratamento. Ainda, P<0,05 para estímulo com insulina (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

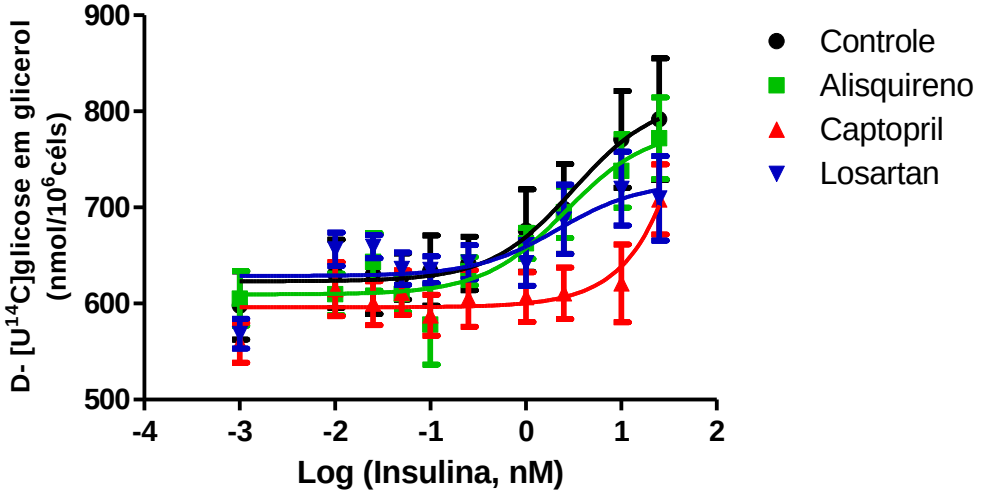

Figura 6. Curva dose resposta de incorporação de glicose em glicerol de adipócitos isolados. Comparação da curva dose resposta à insulina na incorporação de D-[U ^{14}C]-glicose em glicerol de triacilglicerol em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. Os pontos representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). P<0,05 para variável tratamento. Ainda, P<0,05 para estímulo com insulina (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

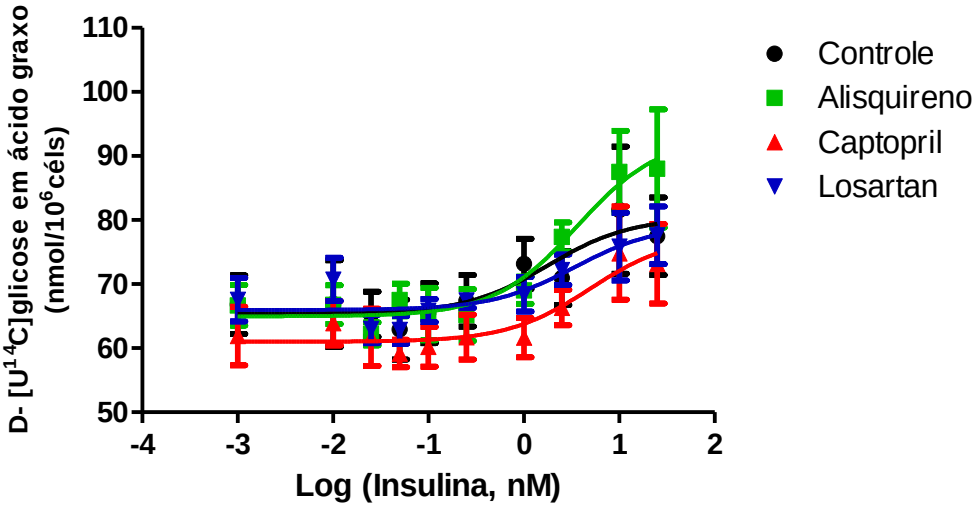

Figura 7. Curva dose resposta de incorporação de glicose em ácido graxo de adipócitos isolados. Comparação da curva dose resposta à insulina na incorporação de D-[U ^{14}C]-glicose em ácido graxo de triacilglicerol em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. Os pontos representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). Não houve diferença entre os tratamentos. Entretanto, houve diferença P<0,05 para estímulo com insulina (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

As figuras 8-11 mostram em detalhes as diferenças encontradas nas figuras anteriores (6-9).

A figura 8 demonstra um aumento na capacidade de oxidação de glicose no grupo tratado com Alisquireno quando há estimulo com insulina na dose de 10 nM.

Na figura 9 e 10 podemos observar uma diminuição na capacidade de incorporação de D-[U-14C]-glicose em lipídios e glicerol (respectivamente) em células previamente tratadas com Captopril quando há estimulo com insulina na dose de 10nM.

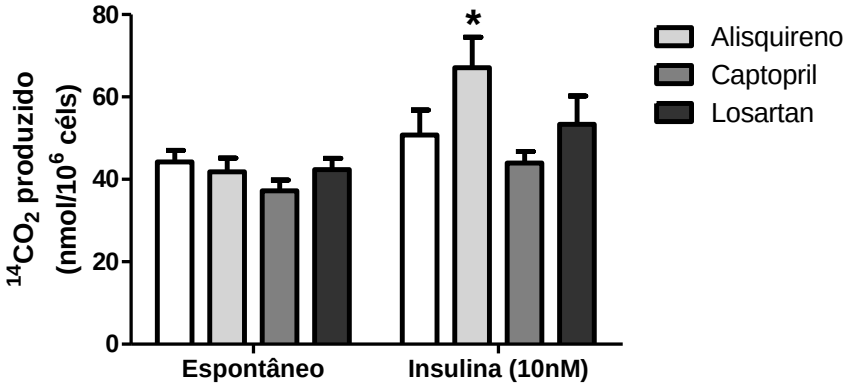

Figura 8. Capacidade de oxidação de glicose em adipócitos isolados. Comparação de produção de $^{14}CO_2$ a partir de D-[U ^{14}C]-glicose em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). * P<0,05 vs. Captopril e P=0,058 vs. Controle, estimulados por insulina. Ainda, P<0,05 entre estado espontâneo e estimulado por insulina (10 nM). (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

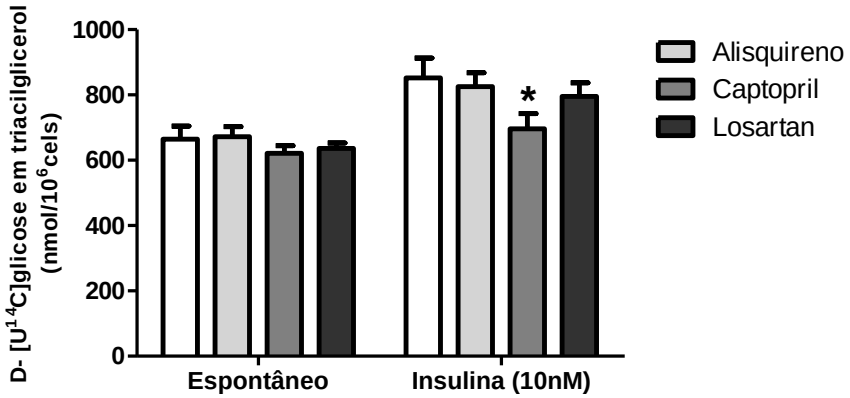

Figura 9. Capacidade de incorporação de glicose em lipídeos de adipócitos isolados. Comparação da incorporação de D-[U ^{14}C]-glicose em triacilglicerol de adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). P<0,05 vs. Controle. Ainda, P<0,05 entre estado espontâneo e estimulado por insulina (10 nM). (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

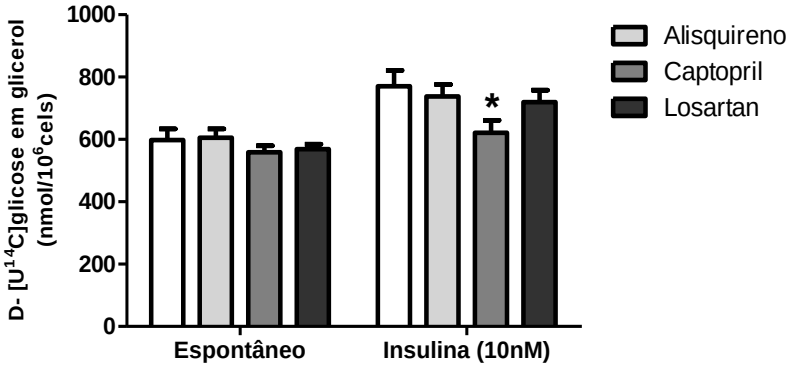

Figura 10. Capacidade de incorporação de glicose em glicerol de adipócitos isolados. Comparação da incorporação de D-[U ^{14}C]-glicose na porção glicerol de triacilglicerol de adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). * P<0,05 vs. Controle e Alisquireno estimulados por insulina. Ainda, P<0,05 entre estado espontâneo e estimulado por insulina (10 nM). (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

Por sua vez, a figura 11 demonstra não haver diferença significativa na síntese de ácidos graxos a partir de D-[U ^{14}C]-glicose entre os grupos.

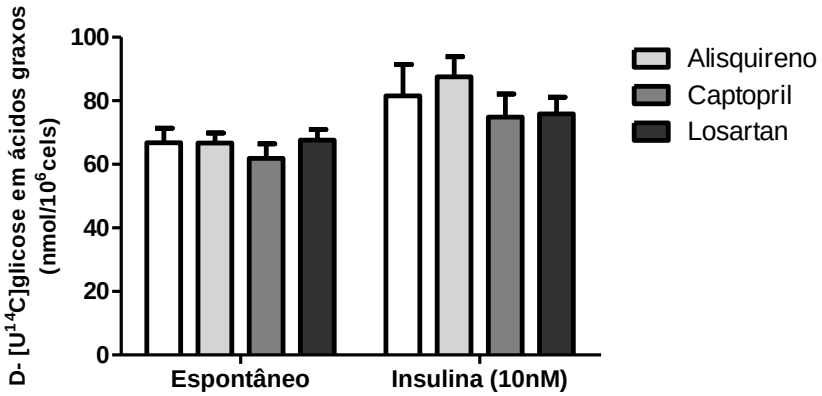

Figura 11. Capacidade de incorporação de glicose em ácidos graxos de adipócitos isolados. Comparação da incorporação de D-[U ^{14}C]-glicose na porção ácidos graxos de triacilglicerol de adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). Não houve diferença entre os tratamentos. Entretanto, houve diferença (P<0,05) entre estado espontâneo e estimulado por insulina (10 nM). (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

4.3.1 Relação entre oxidação e incorporação de glicose em lipídeos

As figuras 12 e 13 apresentam a relação entre glicose oxidada ou incorporada em lipídeos.

Na figura 12, observamos como se comporta essa relação frente a diversas doses de insulina, demonstrando que apenas os adipócitos previamente tratados possuem uma relação linear ao longo do crescente estimulo. Na figura 13, destacamos os principais pontos de diferença induzidas pelos tratamentos. Destaque para o fármaco Alisquireno.

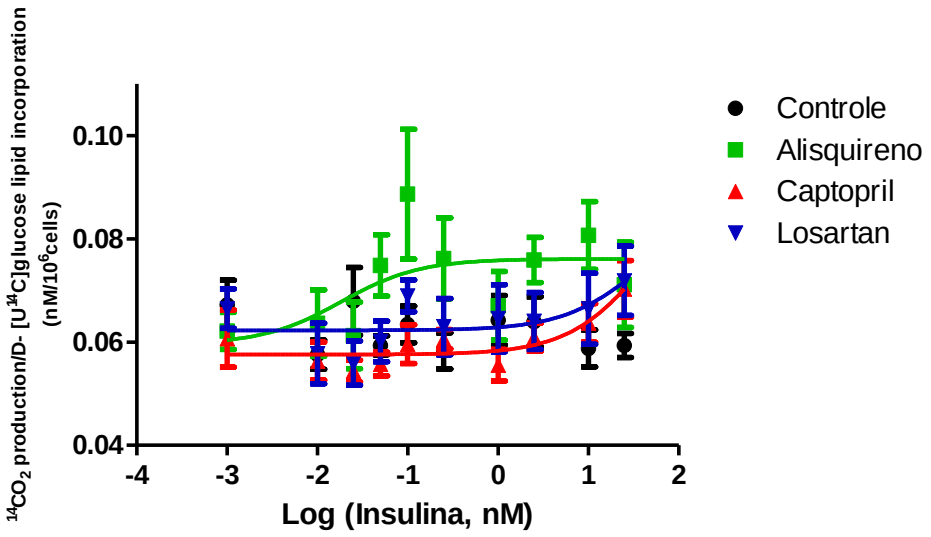

Figura 12. Curva dose resposta da relação oxidação de glicose/incorporação em lipídeos de adipócitos isolados. Comparação de relação de produção de $^{14}CO_2$ a partir de D-[U ^{14}C]-glicose/ incorporação em triacilglicerol em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. Os pontos representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). P<0,05 para variável tratamento e para estímulo com insulina (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

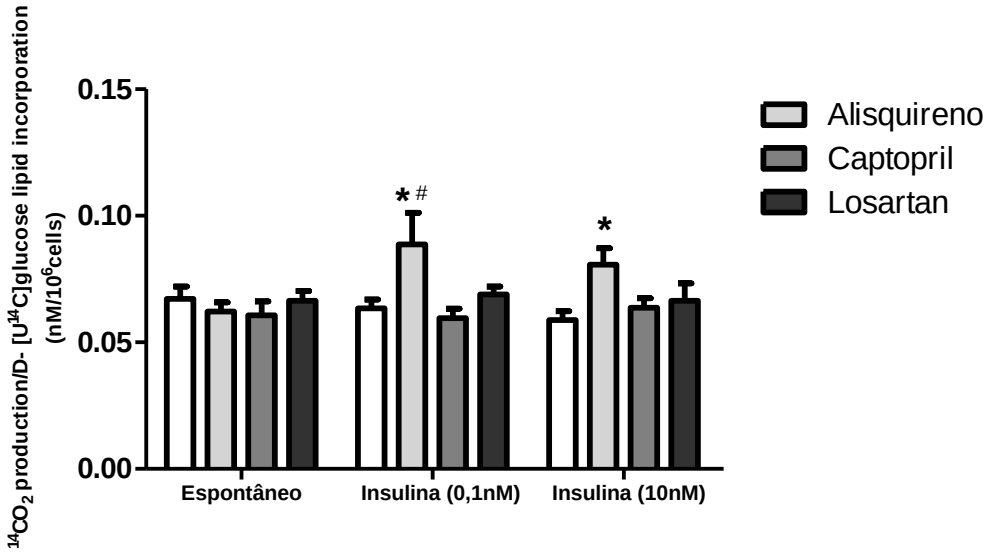

Figura 13. Relação oxidação de glicose/incorporação em lipídeos de adipócitos isolados. Comparação de produção de $^{14}CO_2$ a partir de D-[U ^{14}C]-glicose em adipócitos isolados (PE) previamente tratados com 1 µM de Alisquireno, Captopril e Losartan. Medida expressa em nmol/ 10^6 células. As barras representam as médias ± EPM dos grupos (n=6). * P<0,05 vs. Controle e Captopril e # P<0,05 vs Losartan. Diferenças presentes nos respectivos estímulos. (ANOVA, Two Way, pós-teste Bonferroni).

4.4 Avaliação da expressão gênica

4.4.1 Genes Padronizados

As expressões gênicas de adipócitos isolados tratados com diferentes fármacos bloqueadores do SRA estão mostradas nas figuras 14-16.

Na figura 14, vemos que nenhum dos tratamentos foi capaz de modular a expressão gênica dos componentes do SRA clássico estudados (AGT, ECA e Receptor AT1) em adipócitos isolados.

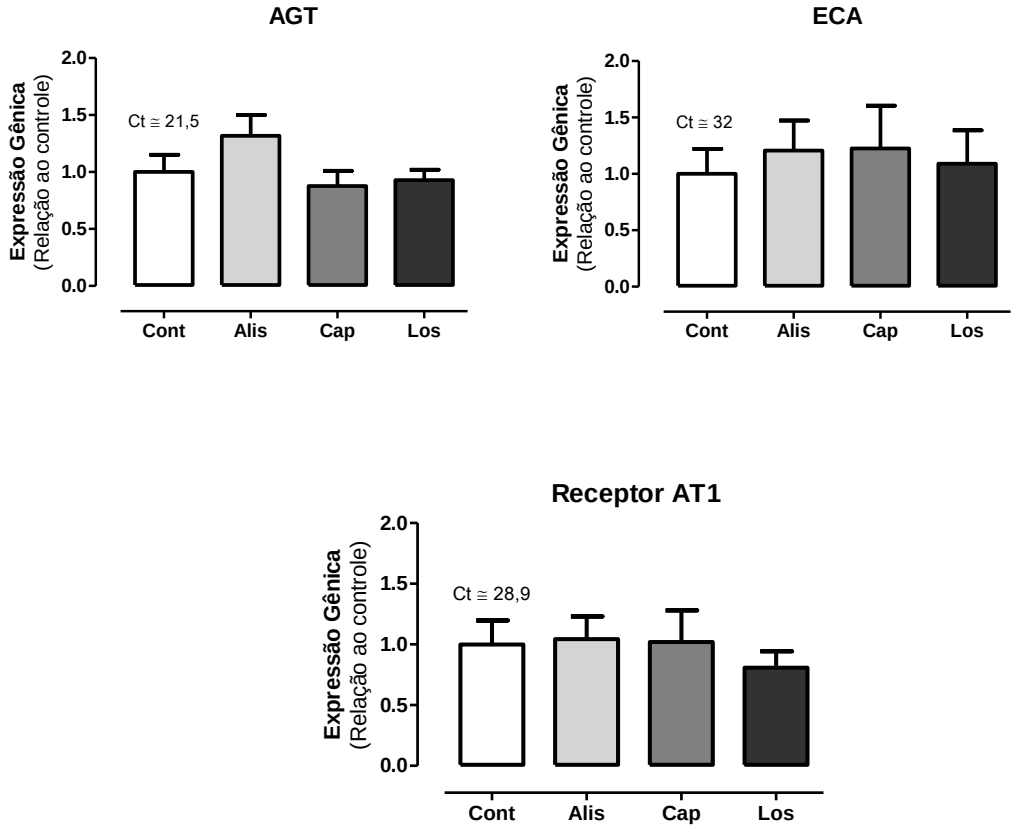

Figura 14. Expressão gênica em adipócitos de componentes clássicos do SRA. Quantificação relativa, utilizando o gene constitutivo Beta 2 M como referência. Expressão de RNAm de AGT, ECA e receptor AT1 em adipócitos isolados tratados com Alisquireno, Captopril ou Losartan (1 µM) por 24 horas. As barras representam médias ± EPM dos grupos (n=6). Não houve diferenças significativas. (ANOVA, One Way).

Na figura 15, estão outros componentes do SRA, como receptores de pró(renina) e ECA 2, bem como receptores de bradicinina 1 e 2. Podemos verificar que o tratamento com Captopril diminuiu a expressão gênica do receptor de pró(renina) em adipócitos isolados.

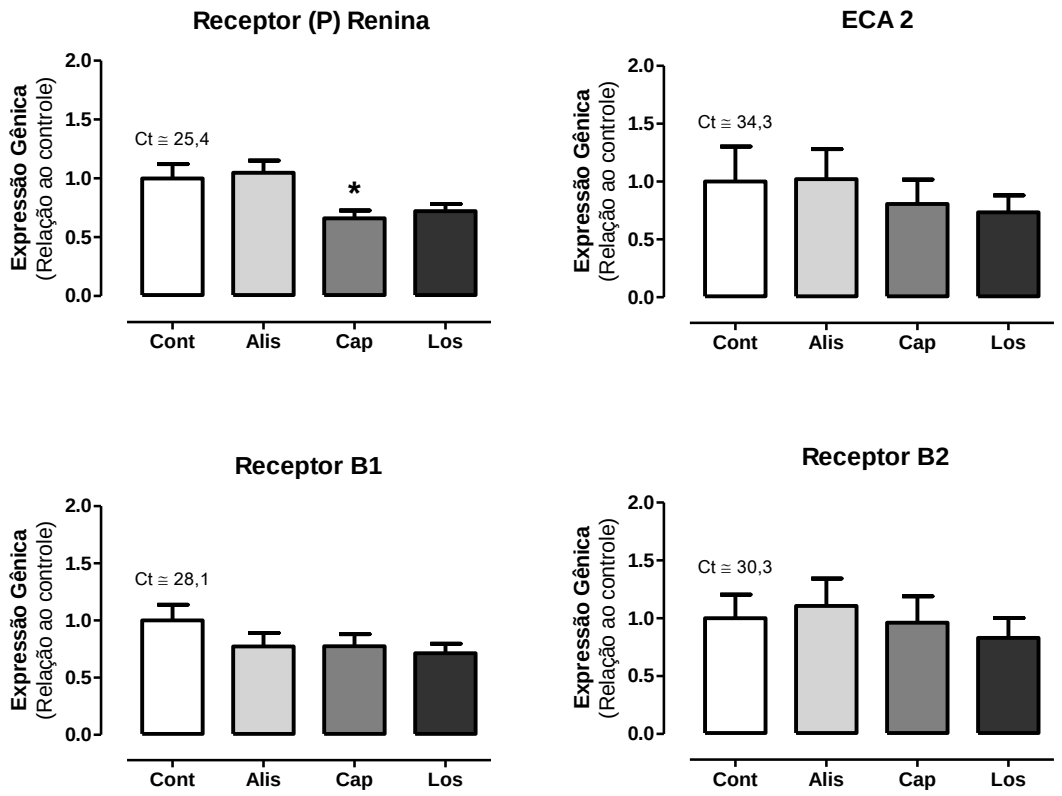

Figura 15. Expressão gênica em adipócitos de outros componentes do SRA e receptores de bradicinina. Quantificação relativa, utilizando o gene constitutivo Beta 2 M como referência. Expressão de RNAm de Receptor de pró(renina), ECA 2 e receptores B1 e 2 de bradicinina em adipócitos isolados tratados com Alisquireno, Captopril ou Losartan (1 µM) por 24 horas. As barras representam médias ± EPM dos grupos (n=6). * P<0,05 vs. Alisquireno e P=0,07 vs. Controle (ANOVA, One Way, pós-teste Bonferroni).

Já na figura 16, demonstramos que a expressão de PPAR γ, bem como a relação entre as expressões gênicas das enzimas homologas ECA2/ECA, em adipócitos isolados não apresentaram diferenças significativas diante dos tratamentos recebidos.

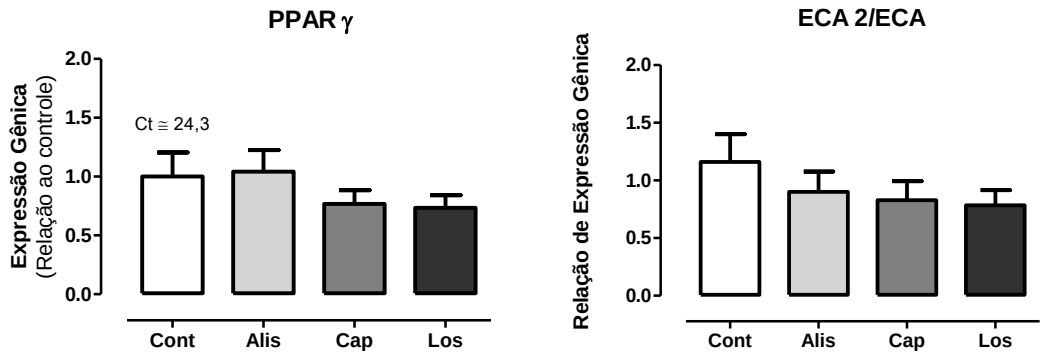

Figura 16. Expressão gênica em adipócitos de PPAR gama e relação d expressão gênica entre ECA2 e ECA. Quantificação relativa, utilizando o gene constitutivo Beta 2 M como referência. Expressão de RNAm de PPAR gama. Ainda, relação da expressão gênica de ECA 2 e ECA em adipócitos isolados tratados com Alisquireno, Captopril ou Losartan (1 µM) por 24 horas. As barras representam médias ± EPM dos grupos (n=6). Não houve diferenças significativas. (ANOVA, One Way).

4.4.2 Comentário sobre expressão gênica de Renina, Receptores AT2 e MAS e Cyp11b2

Em nosso trabalho tivemos a difícil tarefa de padronizar a expressão gênica dos diversos componentes do SRA em adipócitos isolados e incubados com fármacos. Nossos diversos testes demonstraram que a enzima Renina e o gene *Cyp11b2* que codifica a enzima aldosterona sintase, não são expressos de maneira basal em adipócitos. Controladores, como córtex renal e adipócitos tratados com agonista β-adrenérgico, demonstraram que nosso *primer* TaqMan® está em perfeito funcionamento, confirmando os dados sobre a expressão gênica de renina.

Já os receptores AT2 e MAS talvez sejam expressos em adipócitos, entretanto, os Cts médios de amplificação (35,5 e 35,7) não nos permitiram utilizar os dados obtidos, uma vez que saturações de amplificações inespecíficas podem influenciar o resultados. Nesses dados, já eram percebidos a ineficiência em repetir resultados, razão porque não estão apresentados graficamente, até que consigamos padronizar melhor sua expressão (padronização que se estende desde as metodologias de transcrição reversa até a reação do PCR propriamente dita).

5 DISCUSSÃO

Nosso modelo experimental propôs a investigação de efeitos diretos de fármacos bloqueadores do SRA em adipócitos isolados, passando pelos principais eventos metabólicos que ocorrem nesse tipo celular.

Após definirmos a não toxicidade da dose estudada, foi investigado o efeito dos fármacos sobre a capacidade lipolítica frente ao estimulo β-adrenérgico.

Nosso modelo experimental propôs a investigação de efeitos diretos de fármacos bloqueadores do SRA em adipócitos isolados, passando pelos principais eventos metabólicos que ocorrem nesse tipo celular.

Após definirmos a não toxicidade da dose estudada, foi investigado o efeito dos fármacos sobre a capacidade lipolítica frente ao estimulo β-adrenérgico.

Em estudo com adipócitos isolados humanos, foi descrita uma diminuição da lipólise espontânea no tratamento agudo com ANG II. Tal efeito foi abolido com a presença de Losartan (1 μM), evidenciando a participação do receptor AT1 no resultado obtido (Goossens et al., 2007). Em outro estudo, a presença de ANG 1-7 aumentou a lipólise espontânea de adipócitos isolados de ratos de modo dose dependente, bem como produziu efeito sinérgico ao estímulo β-adrenérgico em realizar lipólise. O efeito lipolítico de ANG 1-7 dependeu da ativação do receptor MAS uma vez que a presença de inibidores específicos o aboliu (Oh et al., 2012).

Diante dos dados da literatura que demonstram a participação de angiotensinas em respostas metabólicas de adipócitos, particularmente na lipólise, nossos resultados parecem controversos, uma vez que nenhum dos bloqueadores farmacológicos do SRA interferiu na regulação espontânea ou estimulação β-adrenérgica da lipólise. De fato, angiotensinas, seja a ANG II ou 1-7, influenciam a resposta lipolítica da adipócitos, mas talvez não naquelas concentrações produzidas pelos próprios, ou mesmo em concentrações pressóricas (Townsend, 2001). Em geral, as concentrações de angiotensinas utilizadas nos protocolos experimentais de lipólise são altas, cerca de 10^{-6} M, e ações dos fármacos bloqueadores do SRA só são encontradas nessas condições (Goossens et al., 2007; Oh et al., 2012).

Todavia, ao analisar outros aspectos metabólicos dos adipócitos, foi possível encontrar efeitos induzidos por bloqueadores farmacológicos do SRA.

Nossos experimentos metabólicos foram conduzidos com a concentração de 1 mM de glicose, menor que o Km (isto é, a metade da concentração saturante de

substrato) dos principais transportadores de glicose em adipócitos, GLUT 1 e 4 (Kahn, 1992), com interesse de limitar e igualar a quantidade de glicose transportada entre os grupos, evitando assim que os eventos pós-transportadores observados (isto é, a atividade metabólica) estivessem contaminados pelo maior aporte da glicose em algum dos tratamentos. Por isso, garantimos que a estimulação insulínica observada dependeu de efeitos pós-transportadores envolvendo outros aspectos da metabolização da glicose e no direcionamento desta nas vias metabólicas (glicólise anaeróbia, geração de acetilCoA, geração de citrato, destinação deste para o ciclo de Krebs ou para o citosol a fim de gerar acetil CoA citosólico, síntese de malonil CoA e de ácidos graxos).

Os resultados de oxidação demonstraram um aumento na capacidade de oxidar glicose em adipócitos tratados com Alisquireno, além de uma relação maior entre produção de CO_2 e incorporação de glicose em TAG nas mesmas células.

A produção de CO_2 a partir de glicose pode advir da glicólise e posterior oxidação no ciclo de Krebs. Adipócitos brancos são células metabolicamente pouco ativas, no que diz respeito a consumo de energia, mas problemas em sua capacidade oxidativa (derivadas de disfunções mitocondriais) podem ser associados a distúrbios metabólicos, uma vez que possui influência em determinados processos bioquímicos chaves, como por exemplo, a síntese e esterificação de ácidos graxos (Gaidhu et al., 2010; Kusminski, Scherer, 2012). Por isso, medidas que estimulem o consumo energético em adipócitos, seja por aumento da programação termogênica, ou estimulo da biogênese e capacidade mitocondrial, constituem um tema atual, em contínuo desenvolvimento e discussão, com potencial preventivo e terapêutico em variadas doenças metabólicas como diabetes, obesidade e síndrome metabólica (Bonet et al., 2013; Peschechera, Eckel, 2013; Porter et al., 2013; Spiegelman et al., 2013).

Animais diabéticos do tipo II tratados com Alisquireno já demonstraram maior expressão de UCP-1 (conhecido marcador de programação termogênica) em tecido adiposo branco, do que diabéticos não tratados além de melhora de todo prognóstico de resistência à insulina, de dislipidemias e de excesso de peso (Iwai et al., 2010), o que corrobora com achado de aumento da capacidade em oxidar glicose, uma vez que adipócitos brancos que possuem características termogênicas podem aumentar seu gasto energético independentemente da produção de ATP, através de respiração mitocondrial desacoplada e perdendo energia em forma de

calor (Porter et al., 2013; Spiegelman et al., 2013). Essa hipótese poderá ser testada através da determinação da atividade da enzima citrato sintase, um bom marcador de atividade mitocondrial.

Também há a possibilidade de um aumento da produção de CO_2 advir de sua utilização na via das pentoses. Tal via é extremamente relevante para síntese de ácidos graxos, uma vez que um dos principais compostos resultantes é o $NADPH+H^+$, muito utilizado nas reações catalisadas pela enzima FAS, onde a cada mol de palmitato sintetizado, 14 mols de NADPH são oxidados (Salati, 2011). Entretanto, nenhuma alteração significativa foi encontrada em nossos dados de síntese de ácidos graxos a partir de glicose, o que poderia justificar uma maior atividade da via das pentoses durante a maior síntese de ácidos graxos.

Não obstante, além de ser importante coadjuvante na síntese de ácidos graxos, o NADPH é particularmente necessário durante o estresse oxidativo, pois garante potencial redutor para os maiores sistemas antioxidante, incluindo glutationa redutase. Por isso, o desvio do fluxo metabólico para a via das pentoses pode ser um mecanismo de aumento do potencial antioxidante (Grant, 2008).

Sabe-se que a ANG II é capaz de estimular a atividade do complexo enzimático NAD(P)H oxidase, que possui importante participação nos efeitos biológicos da ANG II (Griendling et al., 1994). Por exemplo, a produção de O_2^- por este complexo atenua a capacidade vasodilatadora do oxido nítrico. (Munzel et al., 1999). Também, a formação de espécies reativas de oxigênio como H_2O_2, é associada à hipertrofia e hiperplasia de células vasculares induzidas pela ANG II (Zafari et al., 1998). Em células musculares lisas de vasos, a ANG II inibe a captação de glicose e aumenta a razão lactato/piruvato em períodos de contração, enquanto a inibição do complexo NAD(P)H oxidase reverte os efeitos encontrados. Uma das conclusões é de que a ANG II aumenta o potencial de estresse oxidante nessas células, pelo aumento de NADH e consumo de NADPH encontrados, com repercussões no metabolismo celular. A inibição do complexo NAD(P)H oxidase neste caso, aumentou a captação de glicose e a oxidação desse substrato (Barron et al., 2004).

Nessa temática, devemos compreender que a ANG II estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, o que deprime o metabolismo energético mitocondrial. Em geral, o bloqueio do SRA reduz a produção de espécies reativas e melhora o conteúdo e função de mitocôndrias. Assim sendo, acredita-se que a ANG II contribui

para o processo de disfunção mitocondrial e que o bloqueio do SRA pode atenuar esse efeito (Cavanagh et al., 2011).

Adicionalmente, alguns trabalhos apontam um efeito protetor contra o estresse oxidativo através do tratamento com Alisquireno (Rashikh et al., 2012) e outros fármacos bloqueadores do SRA (Schramm et al., 2012), mas nem todos conseguem relacionar o efeito protetor exclusivamente a inibição do SRA (Hadoke, 2012; Kuhnast et al., 2012), abrindo a discussão para um possível efeito protetor direto ao estresse oxidativo. Em nosso modelo, a hipótese de aumento da via das pentoses pelo tratamento com Alisquireno poderá ser confirmada pela atividade da enzima G6PDH.

Outro importante evento metabólico estudado foi a capacidade lipogênica dos adipócitos.

Os dados da literatura indicam que todas as etapas do SRA podem estar relacionadas à indução de obesidade e aumento da lipogênese. Entretanto, em certos momentos, há informações conflitantes, principalmente no que diz respeito ao eixo ECA 2/ANG1-7, que em alguns modelos parece influenciar o acúmulo de lipídeos, enquanto, em outros, parece ter efeitos opostos.

Já foi descrito que a ANG II, em doses nanomolares, pode influenciar vias lipogênicas em adipócitos, pelo aumento de NADPH, e expressão gênica de enzimas chaves da síntese de ácidos graxos, como a FAS (Jones et al., 1997). Modelos de obesidade já foram eficazes em induzir aumento de angiotensinas totais no plasma, bem como aumento da atividade da ECA 2 nas fases iniciais de indução de obesidade (Gupte et al., 2008). Também, em animais submetidos à alta ingestão de sacarose, um aumento da lipogênese foi correlacionado a um aumento da atividade e expressão do SRA tecidual, desde os receptores AT1, AT2, até mesmo ECA 2 (Coelho et al., 2010). Em outro estudo, o silenciamento do gene que codifica o AGT em células 3T3-L1, diminuiu o acúmulo de gorduras e a expressão de genes lipogênicos (Carrol et al., 2013). Ainda, a superexpressão de AGT e o consequente aumento de ANG II alteram o genótipo do TAB ao induzir a um aumento dos coxins adiposos por hipertrofia celular e aumento de lipogênese, enquanto a deleção dos receptores AT2 é capaz de prevenir o aumento da massa adiposa e hipertrofia celular (Yvan-Charvet et al., 2009). Por outro lado, de modo crônico, altas concentrações de ANG 1-7 atenuaram o ganho de massa adiposa visceral em modelo de obesidade, bem como diminuiram a expressão de marcadores

inflamatórios (Santos et al., 2012), além de ter sido proposta como principal mecanismo dos benefícios metabólicos do tratamento com Captopril sobre perda de peso e massa adiposa (Oh et al., 2012).

Em nossos resultados, diante do teste de incorporação de glicose em lipídeos, o tratamento com Captopril diminuiu a capacidade lipogênica estimulada por insulina, especificamente na conversão de glicose em glicerol-3-fosfato, mantendo inalterada a síntese de ácidos graxos.

O tratamento com outro inibidor da ECA, o Enalapril, induz a perda de peso em longo prazo além de um aumento na expressão gênica da enzima FAS (Santos et al., 2009) o que, em adição aos nossos dados, nos permite hipotetizar que bloqueadores da ECA são capazes de diminuir a capacidade lipogênica total de adipócitos preservando a capacidade de síntese de ácidos graxos.

Contudo, é perceptível que, ainda que todo o SRA possa influenciar as capacidades lipogênicas, somente o tratamento com Captopril foi capaz de provocar mudanças. Isso talvez pelo fato de que bloqueadores da ECA também repercutem em um sistema de peptídeos paralelo que possui efeitos metabólicos no tecido adiposo, o sistema calicreína-cinina. A inibição da ECA, ou a diminuição de sua atividade, está relacionada à menor inativação de bradicinina e consequente aumento de suas concentrações e efeitos biológicos. Estudos recentes demonstram a participação de receptores B2 e B1 na regulação metabolismo sistêmico e de adipócitos (Mori et al., 2008; 2012). Em cultura de adipócitos, a bradicinina diminuiu a síntese de glicogênio e lipídios estimulada por insulina, apesar de estar associada à translocação de Glut 4 (Kishi et al., 1998).

Apesar disso, não há relatos na literatura que confirmem a possibilidade de adipócitos produzirem todas as etapas do sistema calicreína-cinina, enquanto nossos dados de expressão gênica dos receptores B1 e 2 não demonstraram mudanças significativas com nenhum dos tratamentos, não havendo suporte, ao menos por enquanto, para a participação da bradicinina nos efeitos metabólicos encontrados.

Ainda sobre expressão gênica, em nossa revisão da literatura, observamos que diversos autores relatam a presença de vários, se não todos, os componentes do SRA em tecido adiposo e, particularmente, adipócitos.

Karlsson et al. (1998) demonstrou que adipócitos de indivíduos obesos (29-45 kg/m²) expressavam todos os componentes do SRA até então descritos, incluindo a

enzima renina, bem como a de proteases capazes de produzir angiotensinas por vias independentes de renina e ECA. Também foi demonstrado que o tecido adiposo PE de ratos Sprague-Dawley (280-350 g, 3 meses de idade) expressam todos os componentes clássicos do SRA, ou seja, AGT, Renina, ECA e receptores AT1. Ainda foram encontradas atividades das enzimas renina e ECA, que eram significantemente maiores em adipócitos e estroma vascular, respectivamente, o que é compreensivo uma vez que grande parte da ECA, uma vez sintetizada, é agregada em endotélios e membranas celulares (Pinterova et al., 2000). Além disso, Gupte et al. (2008) demonstrou que tecido adiposo PE de camundongos expressava a enzima ECA 2 e que sua expressão aumentava com a obesidade e hipertensão. Adicionalmente já foi evidenciado que tecido adiposo PE de ratos Sprague-Dawley expressam a proteína MAS, receptor para ANG 1-7 (Oh et al., 2012). Por fim, culturas de adipócitos 3T3-L1 imortalizados também são modelos de estudo intenso do SRA local, seja em células maduras ou em diferenciação. Igualmente, é possível encontrar descrições da expressão de todos os componentes do SRA além da enzima aldosterona sintase (Briones et al., 2012; Carroll et al., 2013; Fowler et al., 2009; Gupte et al., 2008; Mallow et al., 2000).

Contudo, em nossos resultados, não obtivemos expressão gênica das enzimas renina e aldosterona sintase, assim como expressão duvidosa dos receptores MAS e AT2, enquanto os outros componentes do SRA estudados não demonstraram nenhuma mudança significante com os tratamentos farmacológicos, excetuando o receptor de (pró) renina.

Nosso tratamento com Captopril diminuiu a expressão do receptor de (pró) renina nos adipócitos. Esse receptor é conhecido por aumentar a eficiência catalítica da enzima renina, bem como por ativar sua forma inativa, a pró-renina, e induz a vias intracelulares pela fosforilação de resíduos serina e tirosina associado à ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e quinase relacionada com sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) (Nguyen et al., 2002).

Quando ativadas, as quinases MAPK e ERK1/2 estão associadas ao aumento da captação de glicose e adipogênese em pré adipócitos (Sánchez-Solana et al., 2012). Em células epiteliais mamárias humanas, a ativação de ERK1/2 mantém o fluxo de substratos pelo complexo piruvato desidrogenase, que converte piruvato em acetil-CoA, pela inativação da enzima piruvato desidrogenase quinase 4, uma enzima que inibe a atividade da primeira (Grassian et al., 2011).

O complexo piruvato desidrogenase é o principal determinante das taxas de utilização de glicose como fonte de energia celular e sua inativação diminui a captação de glicose, glicólise e oxidação desse substrato (Randle et al., 1994).

A diminuição da expressão do receptor de (pró) renina nos leva à hipótese de que, uma possível diminuição da expressão protéica e funcionamento desse receptor podem diminuir a ativação de MAPK e ERK1/2, o que levaria a uma menor ativação do complexo piruvato desidrogenase e captação de glicose, com consequente diminuição utilização de glicose em processos metabólicos encontradas em nosso modelo de tratamento com Captopril.

A falta de alteração da síntese de ácidos graxos, e de mudança significativa da capacidade oxidativa, nos orienta a suspeitar de mudanças metabólicas entre o inicio da glicólise, passando pela conversão de diidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato pela ação da enzima GPDH, ou até na conversão de oxaloacetato em fosfoenol piruvato pela ação da PEPCK, a principal enzima envolvida na gliceroneogênese.

Pouco conseguimos relacionar da expressão gênica de receptores de (pró) renina e a modulação das enzimas envolvidas na produção de glicerol. Em outros modelos celulares, os efeitos das mesmas vias de sinalização do receptor de (pró) renina nas enzimas citadas são conflitantes, como por exemplo: em células renais, a via da MAPK, induz a transcrição gênica da enzima PEPCK (Feifel et al., 2002), todavia, a inativação da MAPK, por fosfatases específicas, aumenta a expressão de PEPCK em células hepáticas (Xu et al., 2005). Portanto, tais inferências sozinhas não respondem aos nossos questionamentos e não permitem relacionar os eventos metabólicos e a expressão gênica do grupo tratado com Captopril.

Por fim, sobre a expressão/ativação de PPARγ no tecido adiposo, a literatura possui exemplos onde o fármacos bloqueadores do SRA promovem o aumento desse fator de transcrição, (Santos et al., 2009; Iwai et al., 2010) correlacionando-o com melhor função tecidual e sensibilidade à insulina. Também, o aumento da atividade do SRA foi correlacionado a diminuição da expressão de PPARγ no tecido adiposo (Krskova et al., 2011). Em nossos resultados, os bloqueios farmacológicos do SRA não foram eficazes em promover mudanças na expressão gênica de PPARγ em adipócitos isolados. Isso nos leva a refletir sobre os resultados encontrados na literatura.

Alguns fármacos bloqueadores do SRA possuem efeito de ligação direta em PPARγ (Storka et al., 2008), o que ocorre em intensidades diferentes, de acordo com o fármaco utilizado. Dentre os bloqueadores do SRA, o bloqueador de receptor AT1, telmisartan, se revelou um dos mais potentes agonistas parciais de PPARγ. (Erbe, 2006; Kurtz, 2005). O bloqueador de receptor AT1, Losartan, em altas doses (10^{-4}M), possuía capacidade de agonismo de PPARγ em cultura de adipócitos através de alguns metabólitos (Schupp et al., 2006). Mas em nossos dados, bem como no estudo de Schupp et al. (2006), o Losartan em doses de 10^{-6}M não estimulou de modo direto ou indireto a expressão ou ativação de PPARγ. Cabe lembrar que em casos de ativação pelo agonismo de ligantes, a expressão de PPAR γ tende a diminuir, enquanto com estímulos indiretos a expressão tende a aumentar (Hauser et al., 2000). Já outros os fármacos utilizados, Alisquireno e Captopril, ainda não foram descritos como potentes agonistas parciais de PPARγ, o que justifica o resultado da expressão gênica inalterado.

Entretanto, não somente esta hipótese deve ser considerada no estímulo de PPARγ. Também já foi demonstrado em cultura de células musculares lisas que a ANG II inibe a ativação de PPARγ via quinases de serina/treonina (Alexis et al., 2009). Contudo, esse efeito parece não ter acontecido em nosso modelo, talvez pela presença insignificante, ao menos para esse efeito, de ANG II.

6 CONCLUSÕES

Dentre os fármacos bloqueadores do SRA estudados, o Alisquireno e o Captopril apresentaram influências significativas nos parâmetros estudados, sendo eles:

- aumento da relação entre oxidação de glicose e incorporação desse substrato em lipídeos, frente a estimulo de insulina no grupo tratado com Alisquireno;
- diminuição da incorporação de glicose em lipídeos, particularmente na fração glicerol do TAG mediante estímulo com insulina no grupo tratado com Captopril, bem como diminuição da expressão gênica de receptor de (pró) renina.

Por fim, nenhum dos fármacos foi capaz de alterar a capacidade lipolítica estimulada pelo agonismo β-adrenérgico, expressão gênica dos componentes do SRA estudadas e do fator de transcrição PPARγ .

REFERÊNCIAS[1]

Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ.Obesity (Silver Spring). 2006;Suppl 5:242S-9S.

Alexis JD,Wang N, Che W,et al.Bcr kinase activation by angiotensin II inhibits peroxisome-proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity in vascular smooth muscle cells. Circ Res. 2009;104:69-78.

Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2010;50:439-65.

Barron JT, Sasse MF, Nair A. Effect of angiotensin II on energetics, glucose metabolism and cytosolic NADH/NAD and NADPH/NADP redox in vascular smooth muscle. Molecular and Cellular Biochemistry. 2004;262:91-9

Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. Hypertens. 2001;38:1246-9.

Bonet ML,Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. Biochim Biophys Acta. 2013;1831:969-85.

Boschmann M, Nussberger J, Engeli S,et al.Aliskiren penetrates adipose and skeletal muscle tissue, and reduces renin–angiotensin system activity in obese hypertensive patients. J Hypertens. 2012;30:561–6.

BrionesAM, Nguyen Dinh Cat A, Callera GE,et al. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. Hypertension. 2012;59:1069-78.

Brody R, Peleg E, Grossman E,et al.Production and secretion of adiponectin from 3T3-L1 adipocytes: comparison of antihypertensive drugs. Am J Hypertens. 2009;22:1126-9.

Carroll WX, Kalupahana NS, Booker SL,et al.Angiotensinogen gene silencing reduces markers of lipid accumulation and inflammation in cultured adipocytes. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;4:10.

Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, et al. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. Diabetes. 1997;46:1950-7.

Carvalho DS, Villaça V, Brenelli SL, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor increases insulin-induced pp185 phosphorylation in liver and muscle of obese rats.Biochem Mol Biol Int. 1998;46:259-66.

---

[1]De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Cases S, Smith SJ, Zheng YW, et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis.Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:13018-23.

Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L. Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria? Cardiovasc Res. 2011;89:31-40.

Ceddia RB, William WN Jr, Lima FB, et al. Leptin inhibits insulin-stimulated incorporation of glucose into lipids and stimulates glucose decarboxylation in isolated rat adipocytes. J Endocrinol. 1998;158:R7-9

Coelho MS, Lopes KL, Freitas Rde A, et al. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. Regul Pept. 2010;162:61-7.

Davies BS, Beigneux AP, Fong LG, et al. New wrinkles in lipoprotein lipase biology. Curr Opin Lipidol. 2012;23:35-42.

Di Girolamo M, Mendlinger S, Fertig JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. Amer. J. Physiol. 1971;221:850-8.

Dole VP, Meinertz H. Microdetermination of long-chain fatty-acids in plasma and tissues. The Journal of Biological Chemistry.1960;235:2595-9.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ. Res. 2000;87:e1–8.

Erbe DV, Gartrell K, Zhang YL, et al. Molecular activation of PPAR gamma by angiotensin II type 1-receptor antagonists. Vascul Pharmacol. 2006;45:154-62.

Feifel E, Obexer P, Andratsch M, et al. p38 MAPK mediates acid-induced transcription of PEPCK in LLC-PK(1)-FBPase(+) cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2002;283:F678-88.

Fowler JD, Johnson ND, Haroldson TA, et al. Regulated renin release from 3T3-L1 adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296:E1383-91.

Fuentes P, Acuña MJ, Cifuentes M, et al. The anti-adipogenic effect of angiotensin II on human preadipose cells involves ERK1,2 activation and PPARG phosphorylation. Journal of Endocrinology. 2010; 206, 75–83.

Fujimoto AM, Masuzaki H, Tanaka T, et al. An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. FEBS Letters. 2004;576:492–7.

Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, et al. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. Journal of Hypertension. 2004;22:1977-82.

Gaidhu MP, Anthony NM, Patel P, et al. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298:C961–71.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol. 2010;316:129-39.

Goossens GH, Blaak EE, Arner P, et al. Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. Int J Obes (Lond). 2007;31:382-4.

Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. J Biol. 2008;7:1.

Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL, et al. Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. Genes Dev. 2011;25:1716-33.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res. 1994;74:1141-8.

Gupte M, Boustany-Kari CM, Bharadwaj K et al. ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulatedby a high-fat diet. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295:R781-8.

Hadoke PW. Does the combination of a renin inhibitor with a statin have potential for improved inhibition of atherosclerosis? J Hypertens. 2012;30:40-1.

Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, et al. Degradation of the peroxisome proliferator activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. J Biol Chem. 2000;275:18527-33.

Hoene M, Weigert C. The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. Obes Rev. 2008;9:20-9.

Hung WW, Hsieh TJ, Lin T, et al. Blockade of the renin-angiotensin system ameliorates apelin production in 3T3-L1 adipocytes. Cardiovasc Drugs Ther. 2011; 25:3-12.

Iwai M, Kanno H, Tomono Y, et al. Direct renin inhibition improved insulin resistance and adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-Ay mice. Journal of Hypertension, 2010;28:1471-81.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, et al. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. Diabetes. 2002;51:1699-707.

Janke J, Schupp M, Engeli S, et al. Angiotensin type 1 receptor antagonists induce human in-vitro adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. J Hypertens. 2006;24:1809-16.

Jensen C, Herold P, Brunner HR. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. Nat Rev Drug Discov. 2008;7:399-410.

Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. Endocrinology. 1997;138:1512-9.

Kahn BB. Facilitative glucose transportres: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. J Clin Invest. 1992;89:1367-74.

Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, et al. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:3925-9.

Kishi K, Muromoto N, Nakaya Y, et al. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. Diabetes. 1998;47:550-8.

Kloet AD, Krause EG, Kim DH, et al. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. Endocrinology. 2009;150(9):4114-23.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. Circulation. 2005;111:1806-13.

Krskova K, Filipcik P, Zilka N, et al. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme mRNA decrease and AT1 receptor mRNA and protein increase in epididymal fat tissue accompany age-induced elevation of adiposity and reductions in expression of Glut 4 and peroxisome proliferator-activated receptor (PPARγ). J Physiol Pharmacol, 2011;62:403-10.

Kühnast S, van der Hoorn JW, van den Hoek AM, et al. Aliskiren inhibits atherosclerosis development and improves plaque stability in APOE*3Leiden.CETP transgenic mice with or without treatment with atorvastatin. J Hypertens. 2012;30:107-16

Kurtz TW. Treating the metabolic syndrome: telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator. Acta Diabetol. 2005;42:S9–S16.

Kusminski CM, Scherer PE. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. Trends Endocrinol Metab. 2012;23:435-43.

Langin D. In and Out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. Cell Metabolism. 2011;14:569-70.

Mallow H, Trindl A, Löffler G. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Horm Metab Res. 2000;32:500-3.

Marks LS, Maxwell MH Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. Hypertension. 1979;1:384-8.
Moisés RS, Carvalho CR, Shiota D, et al. Evidence for a direct effect of captopril on early steps of insulin action in BC3H-1 myocytes. Metabolism. 2003;52:273-8.

Mori MA, Araújo RC, Reis FC, et al. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. Diabetes. 2008;57:1491-500.

Mori MA, Sales VM, Motta FL, et al. Kinin B1 receptor in adipocytes regulates glucose tolerance and predisposition to obesity. PLoS One. 2012;7:e44782.

Munzel T, Hink U, Heitzer T, et al. Role for NADPH/NADH oxidase in modulation of vascular tone. Ann NY Acad Sci. 1999;874:386-400.

Nakagami H, Osako MK, Morishita R. Potential effect of angiotensin II receptor blockade in adipose tissue and bone. Curr Pharm Des. 2013;19:3049-53.

Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest. 2002;109:1417-27.

Oh YB, Kim JH, Park BM, et al. Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7). Peptides. 2012;37:79-85.

Peschechera A, Eckel J. "Browning" of adipose tissue - regulation and therapeutic perspectives. Arch Physiol Biochem. 2013;119:151-60.

Pinterova L, Krizanova O, Zorad S. Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. Gen Physiol Biophys. 2000;19:329-34.

Porter C, Børsheim E, Sidossis LS. Does adipose tissue thermogenesis play a role in metabolic health? J Obes. 2013;2013:204094.

Randle PJ, Priestman DA, Mistry S, et al. Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. Diabetologia. 1994;Suppl 2:S155–61.

Rashikh A, Pillai KK, Ahmad SJ, et al. Aliskiren alleviates doxorubicin-induced nephrotoxicity by inhibiting oxidative stress and podocyte injury. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2013;14:14-22.

Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. J Biol Chem. 2003;278:30413-6.

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells 1. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis, J. Biol. Chem.1964;239:375–80.

Salati LM. Regulation of fatty acid biosynthesis and lipolysis. Comprehensive Physiology. 2011;495-527.

Sánchez-Solana B, Laborda J, Baladrón V. Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. Mol Endocrinol. 2012;26:110-27.

Santos EL, de Picoli Souza K, da Silva ED, et al. Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. Biochemical Pharmacology. 2009;78:951–8.

Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, et al. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. Regul Pept.2012;178:64-70.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:8258-63.

Schramm A, Matusik P, Osmenda G, et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. Vascul Pharmacol. 2012;56:216-31.

Schupp M, Lee LD, Frost N, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. Hypertension. 2006;47:586-9.

Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. Diabetes. 2013;62:1774-82.

Storka A, Vojtassakova E, Mueller M, et al. Angiotensin inhibition stimulates PPAR gamma and the release of visfatin. Eur J Clin Invest. 2008;38:820-6.

Strazzullo P, Galletti F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. Curr Opin Nephro Hypertens. 2004;13:325-32.

Stucchi P, Cano V, Ruiz-Gayo M, et al. Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity. Br J Pharmacol. 2009;158:771-8.

Sul HS, Wang D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. Annu Rev Nutr. 1998;18:331–51.

Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. Regul Pept. 2001;99;87-92.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem. 2000;275:33238–43.

Townsend RR. The effects of angiotensin-II on lipolysis in humans. Metabolism. 2001;50:468-72.

Turkish AR, Sturley SL. The genetics of neutral lipid biosynthesis: an evolutionary perspective. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;297:E19-27.

Vila MC, Milligan G, Standaert ML, et al. Insulin activates glycerol-3-phosphate acyltransferase (de novo phosphatidic acid synthesis) through a phospholipid-derived mediator. Apparent involvement of Gi alpha and activation of a phospholipase C. Biochemistry. 1990;29:8735-40.

Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. Biochim Biophys Acta. 2009;1791:501–6.

Whaley-Connell A, Johnson MS, Sowers JR. Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. Prog Cardiovasc Dis. 2010;52:401-9.

William WN Jr, Ceddia RB, Curi R. Leptin controls the fate of fatty acids in isolated rat white adipocytes. J Endocrinol. 2002;175:735-44.

Xu H, Yang Q, Shen M, et al. Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells. J Biol Chem. 2005;280:36013-8.

Yvan-Charvet L, Massiéra F, Lamandé N, et al. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogenin adipose tissue. Endocrinology. 2009;150:1421-8.

Yvan-Charvet l, Quignard-Boulangé A. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. Kidney Int. 2011;79:162-8.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. Hypertension 1998;32: 488-95.