ANDREA STERMAN HEIMANN

**O gene da enzima conversora de angiotensina I
influencia as alterações do diabetes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2003

ANDREA STERMAN HEIMANN

**O gene da enzima conversora de angiotensina I
influencia as alterações do diabetes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2003**

ANDREA STERMAN HEIMANN

**Angiotensin converting enzyme (ACE) gene influences
diabetes phenotype**

**São Paulo
2003**

HEIMANN, A.S. O gene da enzima conversora de angiotensina I influencia as alterações do diabetes.

São Paulo, 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Estudamos a relação entre fenótipos do diabetes e obesidade com o genótipo da ECA, em humanos e camundongos. Analisamos fenótipos relacionados com obesidade em 1600 indivíduos da população de Vitória (genotipados para o polimorfismo I/D da ECA) e em camundongos com 1 a 3 cópias do gene da ECA, submetidos ou não à dieta rica em gordura ou diabetes. Camundongos com 3 cópias e alimentados com dieta rica em gordura apresentaram menor peso, gordura periepididimal e insulinemia. Já no grupo diabético os camundongos com 3 cópias apresentaram maior mortalidade. A relação fenótipo e genótipo encontrada nos camundongos repetiu-se no estudo populacional. Estes resultados dão suporte à idéia de que o gene da ECA é um importante fator determinante nos fenótipos relacionados a doenças complexas como a síndrome X.

HEIMANN, A.S. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene influences diabetes phenotypes.

São Paulo, 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

We studied the relationship between obesity and diabetes phenotypes with ACE genotypes using a human population (1600 individuals where ACE I/D polymorphism was determined) and engineered ACE mice models (nondiabetic or diabetic under high fat diet or control diet). Body weight, periepididymal adipose tissue weight and insulin levels were lower in 3 copies under high fat diet. Diabetic 3 copies mice had higher mortality. Presence of D allele was significantly associated with decreased body fat percentage in individuals who were at increases risk of being hyperinsulinemic. Taken together these results provide evidence for a direct role of ACE in obesity phenotypes, which may be important to unravel the complexities of metabolic syndrome.

ÍNDICE

I. Introdução	2
1. Diabetes Mellitus	2
2. O Sistema Renina-Angiotensina (SRA)	4
3. Obesidade	6
4. Utilização de animais geneticamente modificados no estudo de fenômenos biológicos.	7
5. Hipótese de trabalho	8
II. Objetivos	10
III. Métodos	10
1. Animais.	10
1.1. Genotipagem.	12
2. Protocolo experimental.	13
2.1. Fatores Metabólicos.	13
2.2. Histologia	14
2.3. Atividade da ECA tecidual.	14
3. Identificação de Peptídeos Diferenciados no Tecido Adiposo (comparação entre 1 e 3 cópias do gene da ECA).	15
3.1. Extração de peptídeos do tecido adiposo.	16
3.2. Isolamento dos peptídeos substratos da ECA.	16
3.4. Mutação sítio dirigida e expressão da ECA	17
4. Estudo populacional	19
4.1. Genotipagem para o Polimorfismo da ECA	20
5. Análise estatística.	20
IV. Comentários	20
1. Diabetes	20
2. Obesidade	21
V. Resultados	21
1. Pressão Arterial	22
2. Análise Histológica	24
3. Mortalidade	27
4. Glicemia	29
5. Insulinemia	33
6. Peso	34
7. Peso do tecido adiposo periepídidimo	39
8. Consumo de comida	40
9. Atividade da ECA.	41
10. Pâncreas de peptídeo.	42
11. Dados Populacionais	44
VI. Discussão	45
1. O gene da ECA como um gene que confere suscetibilidade a eventos cardiovascular do diabetes.	45
2. A influência de um genótipo (número de cópia do gene da ECA) sobre a regulação do peso.	48
VII. Referências Bibliográficas	50

I. INTRODUÇÃO

1. Diabetes Mellitus

Os médicos gregos e romanos usavam o termo diabetes para se referirem aos pacientes que excretavam um grande volume de urina, e dividiam o diabetes em dois tipos: diabetes *mellitus*, aquele no qual a urina tinha um gosto adocicado e diabetes *insipidus*, aquele em que a urina não tinha este gosto. Hoje em dia o termo diabetes insípida é reservado às patologias nas quais se tem deficiência na produção ou ação de vasopressina. E o termo diabetes mellitus é usado para as outras alterações que levam à hiperglicemia ¹.

O diabetes é caracterizado por poliúria (alto volume de urina), polidipsia (muita sede), perda de peso, apesar de induzir a aumento do apetite e, principalmente, hiperglicemia. Há inúmeras alterações metabólicas que o diabético pode apresentar, mas as principais são: redução na captação de glicose pelos tecidos (aumento da resistência periférica à insulina) e aumento na concentração de glicose sangüínea no jejum ¹. No diabetes há uma grande quantidade de glicose no espaço intersticial e uma falta de glicose no espaço intracelular, uma situação conhecida como “fome em meio a muita comida” ¹. Este quadro pode ser devido a falhas na captação de glicose pela célula (não por falta de insulina) ou falha na ação ou secreção de insulina.

O diabetes pode ser dividido em duas variantes (tipos 1 e 2) que diferem nos seus padrões de herança, resposta à insulina e origens, e em defeitos genéticos específicos menos comuns das funções das células β das ilhotas endócrinas do pâncreas.

A redução da responsividade dos tecidos periféricos (resistência à insulina) constitui um fator considerável no desenvolvimento do diabetes tipo dois. A resistência à insulina é um fenômeno complexo, que não se limita à síndrome diabética. Tanto na obesidade quanto na gravidez (diabetes gestacional), a sensibilidade nos tecidos-alvo à insulina diminui e pode ocorrer elevação dos níveis séricos de insulina para compensar a resistência ao hormônio.

As bases moleculares da resistência à insulina ainda não estão definidas. Pode haver uma redução do número de receptores de insulina ou um comprometimento da sinalização intracelular desencadeada pela insulina. Do ponto de vista fisiológico, a resistência à insulina resulta na incapacidade da insulina circulante dirigir

apropriadamente o metabolismo de glicose, levando à hiperglicemia mais persistente e, portanto, à estimulação mais prolongada das células β do pâncreas.

Qualquer que seja o mecanismo proposto para o diabetes tipo dois, a obesidade é uma influência ambiental extremamente importante. Cerca de 80% dos indivíduos com diabetes tipo dois são obesos, com maior impacto da gordura abdominal em contraste com a obesidade nos depósitos subcutâneos. Isso ocorre, pois o catabolismo da gordura intra-abdominal fornece ácidos graxos livres para o fígado, enquanto se torna relativamente resistente aos efeitos moduladores da insulina.

Há numerosas complicações associadas ao diabetes. No sistema nervoso central, aparecem microangiopatia, infartos vasculares cerebrais e hemorragias; Periféricamente, observam-se neuropatia periférica e neuropatia autônoma, como, retinopatia, catarata e glaucoma, e distúrbios cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose e risco aumentado de infarto do miocárdio, aterosclerose vascular periférica e até gangrena. No pâncreas, há perda de células das ilhotas, insulite (diabetes mellitus tipo um) e amilóide (tipo dois). Os danos renais incluem nefrosclerose, com glomerulosclerose, arteriosclerose e glomerulonefrite.

Em humanos, a deficiência na secreção de insulina é uma patologia comum, causa do diabetes do tipo 1. Em animais, o diabetes pode ser produzido por pancreatectomia, por administração de aloxana, streptozotocina ou outras drogas que, em doses apropriadas, causam destruição das células β do pâncreas (responsáveis pela síntese de insulina). O diabetes também pode ser produzido em animais de experimentação por drogas que inibem a secreção de insulina e por administração de anticorpos anti-insulina. Há ainda linhagens de animais como camundongos, ratos, hamsters e outros que têm, espontaneamente, uma alta incidência de diabetes mellitus. Um modelo de resistência à insulina em animais é submeter estes a dieta rica em gordura durante longos períodos ².

No mundo moderno ocidental o diabetes mellitus e a hipertensão são duas das doenças mais comuns. Há estimativas de que 2,5 a 3 milhões de americanos tenham concomitantemente diabetes e hipertensão, o que sugere uma associação entre estas duas doenças ³. A prevalência de hipertensão em pacientes diabéticos, especialmente do tipo 2, é maior do que a de hipertensos na população não

diabética^{3, 4}. Em um estudo com pacientes americanos, cerca de 28% já tinham hipertensão no momento do diagnóstico de diabetes mellitus não insulina dependente (NIDDM)³. Em um outro estudo com pacientes japoneses, 43% dos diabéticos (tipo 2) contra 18% dos controles, eram hipertensos³. Até o presente momento, a falta de dados sobre a população brasileira não nos permite fazer qualquer tipo de correlação entre as doenças.

A hipertensão em pacientes diabéticos aumenta muito o risco destes desenvolverem doenças macrovasculares e microvasculares, que já é de 2 a 3 vezes maior em diabéticos do que em pessoas normais⁵. Algumas destas vasculopatias são: a aterosclerose (devido às anormalidades no metabolismo de lípidos⁶⁻⁸), isquemias coronárias, doenças vasculares periféricas, acidentes vasculares cerebrais, retinopatias, nefropatias (diabetes mellitus é a primeira causa de insuficiência renal crônica em humanos⁹) e outras⁴. O diabetes também aumenta o risco de hipertensão, complicações cardiovasculares e outras anormalidades como: obesidade, dislipidemia, alterações nos fatores de coagulação, disfunção das plaquetas, etc⁵.

2. O Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O sistema renina-angiotensina é um dos inúmeros sistemas de controle da pressão arterial. Este sistema é ativado por uma série de estímulos como, por exemplo, queda pressórica para níveis abaixo de 100mmHg¹⁰, restrição salina, etc.

Quando isto ocorre, o rim libera grande quantidade de renina (uma enzima proteolítica que é produzida nas células justaglomerulares). Esta enzima age sobre o angiotensinogênio (uma α - globulina sintetizada no fígado e tecidos adiposos), liberando angiotensina I (um decapeptídeo que se encontra na circulação). A angiotensina I possui pequeno efeito hemodinâmico ou metabólico. Esta é transformada por uma dipeptidase, a enzima conversora da angiotensina I (ECA), em angiotensina II (figura 1)¹¹.

A angiotensina II (considerada até o presente momento a principal substância ativa do SRA) apresenta inúmeras ações, agindo em diversos órgãos diferenciadamente. Ela produz contração arteriolar, aumenta a secreção de aldosterona, causa contração das células mesangiais, resultando na diminuição da filtração glomerular, e age no sistema nervoso central aumentando a sede, a

secreção de vasopressina e ACTH, entre outras ações ¹¹. Todas estas ações contribuem para o aumento da pressão sistólica e diastólica.

Uma aminopeptidase converte a angiotensina II em angiotensina III, que tem 40% do efeito pressor da angiotensina II e 100% do efeito estimulatório sobre a aldosterona ¹¹.

Figura 1: Esquema do SRA.

Os efeitos da angiotensina II estão todos voltados para a restauração dos padrões normais de pressão: a contração arteriolar aumenta a resistência periférica e, conseqüentemente, a pressão se eleva. Por outro lado, o SRA promove um aumento do volume total de sangue (através do aumento da secreção de aldosterona, vasopressina e aumento da sede), o que pode também aumentar a pressão ¹¹.

Esta visão clássica do SRA considerando-o exclusivamente um sistema endócrino tem sido modificada nos últimos anos. A presença do mRNA para os diferentes componentes do SRA em vários tecidos tem sugerido a existência de sistemas locais, que poderiam contribuir para a síntese de angiotensina II. A ECA é uma enzima que está na maioria dos casos na membrana plasmática das células de determinados tecidos - o tecido com maior concentração de ECA é o pulmão - e são estes os locais onde ela age sobre a angiotensina I e outros peptídeos biologicamente ativos ³⁴.

Existem indícios a favor da participação do SRA nos mecanismos de modificação da sensibilidade à insulina ¹²⁻¹⁵ e no desenvolvimento da obesidade. Há inúmeros estudos com inibidores da ECA que relacionam o SRA com o aumento da

sensibilidade à insulina e a diminuição de doenças cardiovasculares relacionadas à obesidade.

3. Obesidade

Existe hoje grande familiaridade com o termo obesidade; entretanto, para a maioria das pessoas este termo está associado com falta de autocontrole. Na realidade, a obesidade é uma desordem complexa que envolve a regulação do apetite e o controle do metabolismo energético. Nos últimos anos, um grande avanço nas técnicas de biologia molecular possibilitou a identificação de diversos peptídeos, proteínas e genes que estão relacionados com o controle de peso, como a leptina, resistina, ghrelina, e o polimorfismo Pro12Ala do gene do receptor PPAR γ , entre outros ¹⁶.

A obesidade está associada com o aumento do risco dos pacientes desenvolverem hipertensão, doenças coronarianas, diabetes, aumento da resistência à insulina e câncer ¹⁷. Além disso, estudos mostram que uma pequena perda de peso ameniza consideravelmente estas condições patológicas associadas ¹⁷.

Se definirmos obesidade como um aumento significativo de peso acima do peso ideal, sendo peso ideal o peso que maximiza a sobrevivência, então 20% da população americana é considerada obesa ¹⁸. Este aumento de peso da população nas últimas décadas é em grande parte atribuída à mudança de hábitos alimentares. Contudo, se isto for verdade, uma questão central pode ser levantada: Em um ambiente relativamente homogêneo, por que existem indivíduos que são magros e outros obesos?

Esta pergunta pode ser respondida através da identificação recente de diversos genes que contribuem pela obesidade, em animais e humanos. Estudos com gêmeos, análise de famílias e estudos com indivíduos adotados indicam que a obesidade é em grande parte resultado de fatores genéticos. Estima-se que em gêmeos os fatores genéticos são responsáveis por 50 a 90% do peso ¹⁹.

Existem vários mecanismos de controle de peso, mas os dois principais são: a ação da leptina e da insulina no sistema nervoso central ²⁰. Leptina e insulina são dois peptídeos produzidos no tecido adiposo e no pâncreas, respectivamente, e agem no sistema nervoso central diminuindo o consumo de comida ^{20,21}. A leptina pode

também alterar o gasto energético, que é uma outra maneira de regular o peso independentemente do consumo de alimento ²².

Outra via de regulação de peso é a regulação local de hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Existem inúmeros peptídeos que podem, via suas cascatas de sinalização intracelular, causar hipertrofia do tecido adiposo, entre eles está angiotensina II. O tecido adiposo é uma grande fonte de produção de angiotensinogênio ²³. Além disso, no tecido adiposo existem os outros componentes do SRA necessários para a produção de angiotensina II, que por sua vez podem induzir hipertrofia dos adipócitos.

Um dos fatores ambientais relacionados com o aumento de peso é a alimentação rica em gordura. A dieta rica em gordura diminui a capacidade dos animais de perderem peso, aumenta a resistência à insulina, a resistência à leptina e a produção de resistina ²¹. Todas estas alterações estão relacionadas com o aumento de peso.

4. Utilização de animais geneticamente modificados no estudo de fenômenos biológicos.

Os animais geneticamente modificados têm sido considerados importantes ferramentas para o desenvolvimento da pesquisa científica atual. A técnica para desenvolvimento de animais geneticamente modificados tem sido aplicada em várias espécies como ovelhas, vacas, galinhas, peixes e camundongos (a espécie na qual se obteve mais sucesso) ²⁴. Estes animais têm sido usados como modelos para o estudo de doenças e seus mecanismos, além de teste para novas terapêuticas. Por exemplo, animais geneticamente modificados com aumento da expressão de uma forma mutante do gene do precursor da proteína β -amilóide (o gene APP) têm uma neuropatologia muito similar à doença de Alzheimer ²⁴. Com este modelo tem-se uma boa oportunidade de testar métodos para a prevenção desta doença.

O refinamento das técnicas de transgenes vem permitindo a manipulação específica de genes que podem ter o seu número de cópias diminuídas para 1 ou zero ("knockout") ou ainda aumentadas para 3 ou 4 cópias ("knockin"). É importante ressaltar que a diferença entre estes animais é somente o número de cópias de um gene específico e esta diferença é congênita. Pelo fato destes animais possuírem esta característica, podemos utilizá-los para testar hipóteses específicas quanto ao

efeito de uma maior ou menor atividade do produto gênico no fenótipo dos animais, sendo que o resto do genoma encontra-se inalterado. Recentemente, o grupo de Smithies (1997) ²⁵ produziu camundongos “knockout” e “knockin” para os genes do angiotensinogênio e da ECA. No nosso trabalho, foram usados camundongos com diferentes números de cópias do gene da ECA (1, 2 ou 3 cópias) para testar a hipótese descrita a seguir.

5. A hipótese de trabalho.

Existem muitos estudos que mostram uma associação entre a ECA e a modificação da sensibilidade à insulina no diabetes, ou ainda o aumento de peso. Estes estudos basearam-se em medidas da atividade das enzimas relacionadas com o SRA ou na utilização de inibidores da ECA ou antagonistas do receptor AT1 da angiotensina II. O ponto crítico de tais estudos é que as intervenções realizadas são limitadas temporal e espacialmente, pois os inibidores utilizados não atingem todos os pontos do organismo de forma homogênea e, além disso, agem por um período restrito. A vantagem de se utilizar animais geneticamente modificados é que a alteração do SRA (no nosso caso, o número de cópias do gene da ECA) é constitucional e vigente desde do desenvolvimento embrionário do animal e, portanto, anterior ao estímulo ambiental introduzido, que foi a alimentação rica em gordura.

Numa primeira fase do nosso trabalho testamos a hipótese de que camundongos geneticamente modificados com somente uma cópia do gene da ECA são menos susceptíveis ao desenvolvimento de complicações decorrentes do diabetes e de alimentação com uma dieta rica em gordura (um modelo de resistência a insulina ²). O oposto pode se conjecturar, com relação aos camundongos geneticamente modificados, com três cópias do gene da ECA.

Com base nos resultados obtidos na primeira fase do nosso trabalho (apresentados a seguir) mostramos a importância dos fatores genéticos (cópias do gene da ECA) na regulação do peso frente a um estímulo ambiental, *alimentação rica em gordura*, já que os animais em questão são geneticamente idênticos exceto pelo número de cópias do gene da ECA, além de estarem submetidos aos mesmos fatores ambientais.

Com estes resultados, podemos formular três hipóteses a respeito do papel dos componentes gênicos na regulação do peso dos animais. O sistema renina

angiotensina local, no tecido adiposo, pode estar agindo na regulação do peso, via angiotensina II (que pode causar hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos) ou via outros peptídeos que não pertencem ao SRA, mas que são gerados ou clivados pela ECA, assim como a angiotensina II.

Outra hipótese é que o SRA está agindo sistemicamente na regulação do peso, e novamente este pode ser um efeito direto de algum componente do SRA ou pode ser outro produto formado pela ECA que esteja envolvido neste processo.

Por último, outro sistema que pode estar ativado ou inibido para compensar a modificação na quantidade endógena de ECA, e este é que estaria agindo na regulação do peso. Esta regulação pode ser local ou sistêmica.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular (“differential display”, biblioteca de subtração, o SAGE e o “cDNA microarray”) tornou-se possível a criação de painéis de expressão gênica, tecido-específicos, associados ou não a determinado estímulo. Isto é muito importante para o atual estudo, já que as diferenças observadas nos grupos de animais estudados se deve exclusivamente ao diferente número de cópias de um único gene. Mais recentemente novas técnicas para isolamento de peptídeos possibilitaram a identificação de substratos peptídicos tecido-específicos de enzimas e a comparação destes em diferentes situações fisiológicas^{34,35}. Além disso, sabemos que do total de 40-60 mil genes contidos no genoma humano, a função da grande maioria é ainda desconhecida²⁶, o que abre um grande horizonte para a descoberta de novos genes relacionados aos diversos sistemas biológicos. Desta forma, foram usadas estratégias que visam identificar novos substratos (produtos gênicos) e proteínas, que participam do controle de peso de animais com diferentes cópias do gene da ECA e submetidos à dieta rica em gordura.

II. OBJETIVOS

1. Testar a hipótese de que o gene da ECA é um gene de suscetibilidade a consequências do diabetes.
2. Identificar substratos peptídicos da ECA e os componentes gênicos (genes candidatos) responsáveis pela diferença de peso nos animais com a quantidade endógena e atividade de ECA modificada e submetida à dieta rica em gordura.

3. Verificar se a relação fenótipo/genótipo encontrado nos camundongos com diferentes números de cópias do gene da ECA e alimentados com dieta rica em gordura é semelhante ao verificado no ser humano. Para tanto, uma análise de variantes genéticas da ECA e fenótipos de obesidade foram avaliados em uma amostra populacional humana.

III. MÉTODOS

1. Animais.

Foram utilizados camundongos machos (C57BL/6J), modificados geneticamente, contendo 1, 2 ou 3 cópias do gene da ECA. Imediatamente após o desmame, com 3 semanas de idade, os animais foram submetidos à genotipagem e aleatoriamente separados em diferentes grupos, alimentados ou não com dieta rica em gordura (tabelas 1 e 2 e figura 2) e tratados ou não com Losartan (120 mg/L - Merck)⁴², que é um potente inibidor do receptor AT1 de angiotensina II. Os diferentes tipos de dieta foram mantidos durante todo o estudo (27 semanas) seguindo o protocolo de Luo et al modificado²⁷. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ao redor de 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram obedecidas as regras de ética para experimentação em animais da nossa instituição.

Grupo	Número de cópias do gene da ECA	Tipo de Dieta	Streptozotocina	Losartan
1	1, 2, 3	Rica em Gordura	Diabético	Não
2	1, 2, 3	Controle	Diabético	Não
3	1, 2, 3	Rica em Gordura	Não Diabético	Não
4	1, 2, 3	Controle	Não Diabético	Não
5	3	Rica em Gordura	Não Diabético	Sim

Tabela 1: Grupos experimentais

Ingredientes (%)	Dieta Controle	Dieta Rica em Gordura
Óleo de Coco	5.00	35.50
Caseína	26.14	26.14
Amido	56.36	33.76
Frutose	3.00	0.00
Fibras	5.00	0.10
Minerais	3.50	3.50
Vitaminas	1.00	1.00

Tabela 2: Composição das dietas utilizadas em %. Estas dietas foram baseadas em um estudo feito por Ikemoto et al ²⁸.

Figura 2: Protocolo experimental.

1.1. Genotipagem.

No dia do desmame os animais foram anestesiados com éter, identificados com um "chip" subcutâneo e biópsias da orelha direita foram retiradas. O DNA genômico foi extraído das amostras de orelhas a partir da digestão com proteinase K e precipitação do DNA com isopropanol.

Para a criação dos animais geneticamente modificados, o grupo de O Smithies utilizou a técnica de recombinação gênica²⁹. Esta técnica consiste em inserir por recombinação uma seqüência de DNA no lugar do gene a ser desativado, ou inserir uma cópia extra de um gene ao "lado" do gene existente. Os nossos animais possuem inserido o gene que confere resistência à neomicina entre o exon 14 e o intron 13 (animais "knockout" - gene da ECA modificado), ou inserida uma cópia extra do gene da ECA (animais "knockin" - gene da ECA modificado).

A genotipagem foi realizada através da técnica de PCR, determinando assim o número de cópias do gene da ECA.

No caso dos animais "knockout" foram utilizados três "primers": A, B e C. O "primer" A se localiza à direita da neomicina no exon 14, o "primer" B se localiza à esquerda da neomicina no intron 13 e o "primer" C no gene da neomicina (figura 3).

A ⇒ TAATTCCTTGGGAGGCAGCACT

B ⇒ AGTGGAGGGTATTTGTCAGGGC

C ⇒ TAAAGCGCATGCTCCAGACTGC

Figura 3: Esquema da reação de PCR. A união dos "primers" A e B irá resultar na amplificação de uma seqüência de 265 pares de bases (animais normais - duas cópias do gene da ECA). Já a união dos "primers" B e C resultará na amplificação de uma seqüência de 300 pares de bases (animais knockout).

Para os animais "knockin" foram utilizados dois "primers": D11M⁺ e D11M⁻. O "primer" D11M⁺ amplifica uma sequência de 130 pares de bases (pb) (animais normais - 2 cópias do gene da ECA), e o "primer" D11M⁻ amplifica uma sequência de 166 pb (animais com uma cópia a mais do gene da ECA).

As seqüências dos "primers" são as seguintes:

D11M⁺ ⇒ AAACAGAGATAAACCACGGGG

D11M⁻ ⇒ TGTGGAAGTAACTCTCAGAAGGC

2. Protocolo experimental.

2.1. Fatores Metabólicos.

Após a genotipagem os animais foram separados em gaiolas conforme o número de cópias do gene da ECA (3 animais por gaiola). Ao final da sétima semana de idade, os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas, e após este período foi administrada uma injeção intraperitoneal de streptozotocina (125 mg/kg de peso corpóreo; STZ - Sigma) ou somente o veículo (ácido cítrico 0.05 M, pH 4.5). Os diferentes tipos de dieta foram mantidos durante todo o estudo seguindo o protocolo de Luo et al modificado²⁷.

Entre a sétima e a trigésima semanas de idade determinamos semanalmente o consumo de comida de 24 horas, o peso dos animais, a glicemia, pressão arterial e a frequência cardíaca.

A pressão sistólica caudal de cada animal foi medida por método auscultatório-oscilométrico, sendo que os valores obtidos correspondem à pressão sistólica, em animais acordados, e considerou-se apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. Utilizou-se a média de 10 aferições consecutivas, que não diferiam mais do que 5 mmHg da média encontrada⁴³. A glicemia foi determinada após 6 horas de jejum utilizando-se fitas reativas para medida de glicose (tiras reativas Advantage - Roche). Caso os níveis de glicose estivessem abaixo de 200 mg/dl, uma dose adicional de STZ era aplicada⁴⁴.

Após 27 semanas de dieta (30 semanas de idade) amostras de sangue foram colhidas para a dosagem de insulina (Sensitive rat insulin RIA Kit - Linco research, Inc.)^{6,27,44,45}. Em seguida, os camundongos foram anestesiados com

Ketamina/Xylazina (50 mg/Kg de peso de Ketamina e 10 mg/Kg de peso de Xylazina). O tecido adiposo periepididimal e rim direito foram retirados e congelados em nitrogênio líquido. Após a retirada dos tecidos, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo a uma pressão de 80-90 mmHg, inicialmente com solução fisiológica e a seguir com formalina tamponada 4% com fosfato (pH=7,4). Após a perfusão, o coração (contendo a porção inicial da aorta) e o rim esquerdo foram retirados e submetidos à preparação para análise histológica. O motivo pelo qual preservamos somente a porção inicial da aorta foi a de ser esta a região (os três primeiros milímetros) onde se dá preferencialmente o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos ⁴⁶.

2.2. Histologia

Após o processamento histológico, os cortes da aorta foram corados com hematoxilina-eosina (H-E - para uma análise mais geral dos cortes) e Movat (que vai evidenciar com mais clareza as lesões) ⁴⁶. Os cortes histológicos do tecido renal foram corados com tricrômico de Masson (que possibilita a análise da área de deposição de colágeno), ácido periódico-Schiff (PAS - que irá evidenciar glomerulosclerose) e H-E ⁹. Estas colorações permitem analisar alterações renais e da aorta, que estão ligadas a diabetes e hipertensão, como por exemplo, área de fibrose e tamanho da placa de ateroma.

No estudo histomorfométrico analisamos a relação parede - lúmen da aorta e a área de lesão nos glomérulos renais.

Todos estes testes são indicadores da extensão das lesões como aterosclerose e nefropatias ^{9, 45, 44, 47}.

2.3. Atividade da ECA tecidual.

As amostras de tecido adiposo e rins, obtidas na etapa anterior, foram homogeneizadas em tampão apropriado (para cada 100 mg de tecido foram utilizados 1mL de Tris-HCl, 0.1 M – pH 7.0, contendo 50mM de NaCl). O homogenato obtido foi submetido à centrifugação a 1000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a – 80°C até o dia da dosagem enzimática, a fim de se correlacionar o número de cópias do gene e a atividade tecidual da ECA.

Para o ensaio foram utilizados 5 µL do homogenato tecidual, mantidos sob incubação com uma solução de Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz = ortho-aminobenzol; Dnp =

dinitrophenil) 15 μM em 0.1M de tampão This-HCl contendo 50mM of NaCl e 10 μM ZnCl_2 , pH 7.0, num volume final de 200 μL . Numa segunda etapa, a atividade enzimática foi determinada de forma contínua em fluorímetro ($\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$ e $\lambda_{\text{ex}} = 320\text{nm}$), isto é, medindo-se a fluorescência por 20 minutos (uma leitura por minuto). Este método se baseia na utilização de um peptídeo fluorescente (Abz-FRK(Dnp)P-OH) que é clivado com alta afinidade pela ECA ($K_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 45.4 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Como controle negativo a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH foi abolida no homogenato de tecido por 0.5 μM de captopril.

A partir da leitura das amostras obteve-se uma curva de fluorescência por unidade de tempo e a inclinação desta curva resultou na atividade enzimática da ECA e finalmente convertida em μmol de substrato hidrolisado por minuto.

A atividade enzimática obtida foi normalizada através do conteúdo de proteína de cada amostra, determinada através do método de Bradford.

Finalmente, a atividade da ECA foi expressa em mU/mg de proteína (1mU = nmol of Abz-FRK(Dnp)P-OH hidrolisados por minuto).

3. Identificação de Peptídeos Diferenciados no Tecido Adiposo (comparação entre 1 e 3 cópias do gene da ECA).

Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para o estudo de painéis peptídicos biologicamente ativos de tecidos expostos a diferentes situações fisiológicas^{33,34}. Através destas técnicas, tornou-se possível identificar diferentes peptídeos, responsáveis por um fenótipo.

Neste projeto pretendemos identificar peptídeos substratos da ECA responsáveis pela diferença de peso entre os animais com 1 e 3 cópias do gene e alimentados com dieta rica em gordura.

3.1. Extração de peptídeos do tecido adiposo.

Amostras de tecido adiposo retirados de 5 camundongos de cada grupo foram colocados em ácido acético 0.1 M fervente e homogeneizados (Polytron). O tecido homogeneizado foi mantido a 100 °C por 10 minutos e em seguida submetido a centrifugação por 30 minutos a 4 °C a 50.000g. O sobrenadante foi filtrado em filtro apropriado (*Centrifugal Filter Unit 5,000 NMCO* - Millipore). Acertamos o pH para 7.4 com 1 M tris-HCl da fração de peptídeos que passou pelo filtro.

3.2. Isolamento dos peptídeos substratos da ECA.

Os peptídeos substratos da ECA foram isolados utilizando-se a ECA cataliticamente inativa (que será descrita a seguir).

O complexo enzima-peptídeos foi isolado utilizando-se uma coluna Sephadex G25 (figura 3), anteriormente lavada e equilibrada com TBS. A coluna foi centrifugada a 1000g por 2 minutos para remover o tampão. O complexo enzima-peptídeo foi formado a partir de 1-5nmol da enzima em 200 μ L de reação (25 mM tris-HCl, pH 7.5, contendo 125 mM NaCl e 0.1% albumina de soro bovino). A solução obtida na etapa anterior foi mantida por 30 minutos a temperatura ambiente na presença da mistura de peptídeos extraídos do tecido adiposo. A solução foi transferida para a coluna de Sephadex G25 e centrifugada por 2 minutos a 1000g em temperatura ambiente. O eluato, aproximadamente 200 μ L, foi coletado. O conteúdo de peptídeos analisado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando-se uma coluna Chromolith Performace (100-4.6 mm, Merk), com um gradiente linear de acetonitrila 5-35% e 0.1% TFA, por 20 minutos com um fluxo de 1mL/min. (figura 4)

Foram realizados dois experimentos, um com tecido adiposo de animais com 1 cópia do gene da ECA e outro com tecido de animais com 3 cópias do gene, alimentados com dieta rica em gordura, a fim de se comparar os perfis de peptídeos nas duas situações experimentais.

Figura 4: Método das proteínas magnéticas para isolamento do complexo enzima-substrato por gel filtração em coluna Sephadex G25.

3.4. Mutações sítio dirigida e expressão da ECA.

Foi utilizado para mutação sítio dirigida da ECA o “kit Quick-change site-direct mutagenesis” (Stratagene, LA Jolla, CA) a fim de se introduzir mutações pontuais, no cDNA da ECA selvagem, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Pierre Corvol. “Primers” com a troca de código para Alanina foram sintetizados, tomando-se o cuidado de se utilizar codons de eucariotos para que a proteína expressa não seja truncada. As mutações foram as seguintes: H397A, H995A ou ainda o duplo mutante H397A e H995A.

Para a realização da mutação foi feita uma reação de PCR utilizando-se 50 ng de DNA (cDNA da ECA selvagem), 14 pmol de cada “primer”, 10 nmol de dNTPs e 2.5 U de *turbo Pfu* DNA polimerase (Stratagene). As condições da reação de PCR foram: 30 segundos a 95 °C; 16 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto e 68 °C por 14 minutos, ao final da reação esta foi colocada em gelo por 5 minutos. Um microlitro da enzima *DpnI* (20 U – New England Biolab) foi adicionado à amostra e incubado a 37°C por 16 horas. Após a incubação, 10 µL da reação foram utilizados

para a transformação em bactérias (*E. coli*) competentes por choque térmico. Clones positivos foram escolhidos e seqüenciados para confirmação da introdução das mutações.

As expressões da proteína selvagem e das proteínas mutantes foram inicialmente realizadas em células de ovário de hamster (CHO). As células foram co-transfectadas com o plasmídeo de expressão contendo a seqüência da ECA e um plasmídeo que confere resistência à neomicina. Foi então adicionado ao meio de cultura neomicina para seleção as células resistentes. Foram separadas linhagens de células provenientes de uma única célula e estas testadas para a presença da ECA através de DOT-BLOT com o anticorpo antiECA.

Posteriormente, após verificarmos a funcionalidade das proteínas, expressamos e purificamos as proteínas utilizando-se do sistema do Báculo vírus. Escolhemos este sistema de expressão devido à facilidade de expressão e purificação de proteína em larga escala que ele oferece.

Para a expressão da ECA neste sistema utilizamos o baculovírus BaculoGOLD DNA (PharMingen) e o plasmídeo pBSV-8His (KÜHN, & ZIPFEL, 1995), que foram co-transfectados em células Sf9, de *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen) (figura 5).

Figura 5: Esquema da expressão da ECA em células de inseto infectadas com baculovírus recombinante.

A purificação da proteína selvagem e das mutantes para a caracterização biológica foi feita com coluna de níquel (Invitrogen – ProBond Purification System).

4. Estudo populacional.

Em colaboração com o pesquisador Prof. Dr. José Geraldo Mill da Universidade Federal do Espírito Santo, pudemos participar de um estudo de fatores de risco para doenças cardiovasculares realizado na população de Vitória, ES. Este estudo incluiu 1600 indivíduos e seguiu as normas gerais do projeto WHO-MONICA (Tunstall-Pedoe H) onde vários fenótipos de obesidade foram determinados.

4.1. Genotipagem para o Polimorfismo da ECA.

Cinco mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo EDTA. O polimorfismo I/D do gene da ECA foi determinado utilizando um sistema de 3 “primers”. O produto de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi visualizado por gel de eletroforese (3% gel de agarose) com brometo de etídio e armazenado na forma digital.

5. Análise estatística.

Todos os dados estão apresentados em média e desvio padrão (dp) ou erro padrão da média (epm).

Para que possamos entender mais claramente os resultados, foi utilizado um artifício estatístico que consiste em calcular a média aritmética dos dados de cada mês e fazer a análise estatística destas médias. Esta técnica foi aplicada aos dados de glicemia.

Foi aplicados testes One way-ANOVA e Two way-ANOVA, para análise dos resultados.

Para comparar os grupos sem a interferência da variável tempo, a glicemia média e o peso médio foram calculados utilizando o teorema dos valores médios^{2,33}, isto é, calculando a área debaixo da curva destas variáveis e dividindo esta área pelo tempo de vida de cada animal.

A mortalidade foi analisada de duas formas, a porcentagem de morte foi comparada pelo teste Chi-quadrado e a mortalidade ao longo do tempo por Kaplan-Meier.

Para comparar os dados populacionais analisamos as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos indivíduos pelo teste Chi-quadrado, utilizando o software StatView para Windows versão 5.0. (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA).

Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

Os resultados referem-se aos animais contendo 1, 2 ou 3 cópias do gene da ECA. Estes resultados foram analisados e comparados entre os diferentes grupos, conforme as variáveis de interesse:

- Influência do Diabetes
- Influência da Dieta Rica em Gordura no Diabetes
- Influência da Dieta Rica em Gordura

1. Influência do Diabetes.

Neste item apresentaremos os resultados dos animais com diferentes cópias do gene da ECA alimentados com dieta controle e submetidos ou não ao diabetes por injeção de STZ.

1.1 Pressão Arterial

Com respeito à pressão sistólica, não houve diferença significativa em ter os animais com os diferentes números de cópias do gene da ECA submetidos ou não a diabetes (Figura 6). Isto nos mostra que, apesar de possuírem diferentes números de cópias do gene da ECA, os animais possivelmente possuem mecanismos compensatórios que impedem variações na pressão arterial entre eles.

Figura 6: Média de quatro semanas da pressão sistólica (média $\pm$ sem) dos animais não diabéticos e diabéticos alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

1.2. Mortalidade.

Com respeito à mortalidade notamos uma diferença na taxa de mortalidade conforme o número de cópias do gene da ECA nos animais diabéticos alimentados com dieta controle (tabela 3).

Grupos	Número inicial de animais	Número de animais que morreram ao longo do experimento	Porcentagem de animais que morreram ao longo do experimento
1CD	9	3	33
1CND	8	0	0
2CD	10	4	40
2CND	5	0	0
3CD	9	5	56
3CND	5	0	0

Tabela 3: Mortalidade nos diversos grupos. CND - animais não diabéticos alimentados com dieta controle. CD - animais diabéticos alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 ou 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

Na tabela acima observamos que a mortalidade do grupo diabético é maior do que a do controle. Além disso, a mortalidade dos animais diabéticos com 3 cópias do

gene da ECA é sensivelmente maior do que a dos animais com 1 cópia do gene da ECA (Figura 7). A morte dos animais diabéticos ocorreu ao longo do experimento (Figura 7).

Figura 7: Mortalidade ao longo do tempo dos animais diabéticos alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

1.3. Glicemia.

A glicemia dos animais diabéticos foi elevada (a cima da 200 mg/dL), como esperado para animais que receberam STZ, e os níveis aumentados de glicemia mantiveram-se durante todo o experimento (Figura 8). Não houve diferença na glicemia entre os camundongos com diferentes números de cópias do gene da ECA (Figura 9).

Figura 8: Glicemias dos animais diabéticos alimentados com dieta controle (média $\pm$ epm). Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

Figura 9: Glicemia média (média $\pm$ epm) dos animais não diabéticos e diabéticos alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 significam o número de cópias do gene da ECA.

1.4. Insulinemia.

Apesar de notarmos uma tendência da insulinemia ser maior nos animais não diabéticos, não observamos diferença significativa na insulinemia entre os grupos, nem com relação ao número de cópias do gene da ECA, nem com relação à presença de diabetes (Figura 10).

Figura 10: Insulinemia (média $\pm$ dp) dos animais não diabéticos e diabéticos alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 são referentes ao número de cópias do gene da ECA. * $P < 0,05$ vs. camundongos não diabéticos.

1.5. Peso.

Tanto no grupo controle, quanto no diabético não houve diferença no peso corpóreo quando comparamos o número de cópias do gene da ECA. No entanto, os

animais diabéticos apresentaram uma expressiva queda de peso (Figura 11) e um peso médio menor do que os animais controles (Figura 12), uma característica do modelo de diabetes por STZ.

Figura 11: Peso (média $\pm$ dp) ao longo do tempo dos animais diabéticos ou não alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

Figura 12: Peso Médio (média $\pm$ dp) ao longo do tempo dos animais diabéticos ou não alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA. *P<0,05 vs. não diabéticos.

1.6. Atividade da ECA.

A atividade da ECA medida em homogenato de rim foi maior nos animais com 2 e 3 cópias do gene da ECA em comparação com os de 1 cópia do gene, independentemente da presença ou não do diabetes. Além disso, os animais com 2 e 3 cópias do gene da ECA e diabéticos tiveram menor atividade da ECA quando comparados com os animais não diabéticos, fato não observado nos animais com 1 cópia do gene (Figura 13).

Figura 13: Atividade da ECA renal (média $\pm$ dp) dos animais diabéticos ou não alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA. * $P < 0,05$ vs. animais com 2 e 3 cópias (diabéticos ou não).

1.7. Análise Histológica.

Ao final do protocolo observamos um início de esclerose glomerular nos rins de alguns animais diabéticos (figura 14). Esta não pode ser quantificada devido à pequena extensão da lesão e a não definição da mesma. As pequenas alterações glomerulares foram encontradas em animais com os diferentes números de cópias do gene da ECA (figura 14).

Figura 14: Cortes histológicos de rins de camundongos corados com tricrômico de Masson. (B) a seta indica o início da esclerose renal de animal diabético. (A) glomerulos de um animal controle. 40x de aumento.

Já com respeito às lesões da aorta só foi detectado uma pequena lesão em um único animal não diabético e com 2 cópias do gene da ECA (figura 15). Este pequeno ateroma é considerado normal e não pode ser atribuído ao tratamento.

Figura 15: Corte histológico de aorta corado com movat. A coloração em azul mostra as proteoglicanas; a avermelhada, as células musculares lisas; em preto, a elastina; e, em amarelo, o colágeno. A seta indica o local de formação da placa de ateroma. 100x de aumento.

2. Influência da dieta rica em gordura no Diabetes.

Neste item serão apresentados os resultados dos animais diabéticos (induzida por STZ) ou não, com diferentes números de cópias do gene da ECA e alimentados dieta rica em gordura.

2.1 Pressão Arterial

Com respeito à pressão sistólica, não houve diferença significativa entre os animais diabéticos ou não, com os diferentes números de cópias do gene da ECA submetidos à dieta rica em gordura (Figura 16). Isto nos mostra que, apesar de possuírem diferentes números de cópias do gene da ECA, os animais possivelmente possuem mecanismos compensatórios que regulam variações na pressão arterial entre eles.

Figura 16: Pressão sistólica (média de quatro semanas - média $\pm$ epm) dos animais diabéticos ou não, alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 se referem ao número de cópias do gene da ECA.

2.2. Mortalidade.

Com respeito à mortalidade, notamos uma diferença na taxa de mortalidade conforme o número de cópias do gene da ECA nos animais diabéticos alimentados com rica em gordura (tabela 4).

Grupos	Número inicial de animais	Número de animais que morreram ao longo do experimento	Porcentagem de animais que morreram ao longo do experimento
1FD	12	6	50
1FND	7	0	0
2FD	8	3	37,5
2FND	5	0	0
3FD	10	6	60
3FND	5	0	0

Tabela 4: Mortalidade nos diversos grupos. CND - animais não diabéticos alimentados com dieta controle. CD - animais diabéticos alimentados com dieta controle. Os números 1, 2 ou 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

Na tabela acima observamos que a mortalidade do grupo diabético é maior do que a do controle. Além disso, a mortalidade dos animais diabéticos com 3 cópias do

gene da ECA é maior do que a dos animais com 1e 2 cópias do gene da ECA (Figura 17). A morte dos animais diabéticos ocorreu ao longo do experimento (Figura 17).

Figura 17: Mortalidade ao longo do tempo dos animais diabéticos alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

2.3. Glicemia.

A glicemia dos animais diabéticos foi elevada (a cima da 200 mg/dL) como esperado para animais que receberam STZ e os níveis aumentados de glicemia mantiveram-se durante todo o experimento (Figura 18). Não houve diferença na glicemia entre os camundongos com diferentes números de cópias do gene da ECA (Figura 19).

Figura 18: Glicemia dos animais diabéticos alimentados com dieta rica em gordura (média $\pm$ epm). Os números 1, 2 e 3 referem-se ao número de cópias do gene da ECA.

Figura 19: Glicemia média (média $\pm$ epm) dos animais não diabéticos e diabéticos alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 significam o número de cópias do gene da ECA. * $P < 0,05$ vs. camundongos diabéticos.

2.4. Insulinemia.

A insulinemia dos animais não diabéticos foi significativamente maior do que a dos animais diabéticos. Já com relação ao número de cópias do gene da ECA, a insulinemia dos animais com 1 cópia foi maior no grupo não diabético e menor no grupo diabético (Figura 20).

Figura 20: Insulinemia (média $\pm$ epm) dos animais não diabéticos e diabéticos alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 são referentes ao número de cópias do gene da ECA.

2.5. Peso.

No grupo controle os animais com 3 cópias do gene da ECA tiveram menor peso do que os animais com 1 e 2 cópias do gene. Já no grupo diabético não houve diferença no peso corpóreo quando comparamos o número de cópias do gene da ECA. No entanto, os animais diabéticos apresentaram queda de peso (Figura 21),

que foi maior nos animais com uma cópia do gene da ECA. O peso médio foi menor nos animais diabéticos em comparação com os animais controle (Figura 22).

Figura 21: Peso (média $\pm$ epm) ao longo do tempo dos animais diabéticos ou não alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

Figura 22: Peso Médio (média $\pm$ dp) ao longo do tempo dos animais diabéticos ou não alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA. * $P < 0,05$ vs. diabéticos.

2.6. Atividade da ECA.

A atividade da ECA medida em homogenato de rim foi maior nos animais com 2 e 3 cópias do gene da ECA em comparação com os de 1 cópia do gene, independentemente da presença ou não da diabetes. Além disso, os animais com 1 e 2 cópias do gene da ECA e diabéticos tiveram maior atividade da ECA quando comparados com os animais não diabéticos, fato não observado nos animais com 3 cópias do gene (Figura 23).

Figura 23: Atividade da ECA (média $\pm$ epm) dos animais diabéticos ou não, alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA. * $P < 0,05$ vs. animais com 2 e 3 cópias (diabéticos ou não).

2.7. Análise Histológica.

Ao final do protocolo não observamos esclerose glomerular nos rins dos animais diabéticos ou não. Já com respeito às lesões da aorta também não se detectou lesões em nenhum animal (diabético ou não).

3. Influência da Dieta Rica em Gordura.

Neste item apresentaremos os resultados dos animais não diabéticos, com diferentes cópias do gene da ECA, alimentados com dieta rica em gordura ou controle.

3.1 Pressão Arterial

Com respeito à pressão sistólica, não houve diferença significativa entre os animais não diabéticos, alimentados com dieta controle ou rica em gordura, com os diferentes números de cópias do gene da ECA (Figura 24). Novamente, apesar de possuírem diferentes números de cópias do gene da ECA, os grupos provavelmente

apresentam pressão arterial mantida em valores semelhantes por mecanismos compensatórios.

Figura 24: Média de quatro semanas da pressão sistólica (média $\pm$ epm) dos animais diabéticos ou não alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 se referem ao número de cópias do gene da ECA.

3.2. Mortalidade.

Nos animais não diabéticos (animais que não receberam STZ) não houve morte durante o período de estudo, independentemente da dieta recebida.

3.3. Glicemia.

A glicemia média dos animais alimentados com dieta rica em gordura foi maior do que a dos animais alimentados com dieta controle. Além disso, não houve diferença na glicemia entre os camundongos com diferentes números de cópias do gene da ECA, nas duas dietas (Figura 25).

Figura 25: Glicemia média (média $\pm$ epm) dos animais não diabéticos alimentados ou não com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 significam o número de cópias do gene da ECA. *P < 0,05 vs animais alimentados com dieta controle.

3.4. Insulinemia.

A insulinemia dos animais não diabéticos no momento do sacrifício foi maior no grupo alimentado com dieta rica em gordura, em comparação com os animais alimentados com dieta controle. Esta diferença foi independente do número de cópias do gene da ECA (Figura 26). Com relação ao número de cópias do gene da ECA, os animais com 3 cópias do gene apresentaram a insulinemia menor do que a dos animais com 1 ou 2 cópias.

Figura 26: Valores de insulina (média $\pm$ epm) dos animais não diabéticos alimentados com dieta controle ou rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 são referentes ao número de cópias do gene da ECA. * $P < 0,05$ vs dieta rica em gordura.

3.5. Peso.

Os animais contendo 3 cópias do gene da ECA, alimentados com dieta rica em gordura, tiveram o peso significativamente menor do que animais com 1 e 2 cópias, esta diferença foi mais acentuada após 20 semanas de idade (Figura 27). Além disso, os animais com 3 cópias do gene da ECA alimentados com dieta rica em gordura e que receberam Losartan não apresentaram diferença de peso em relação ao grupo de animais sem Losartan.

Já os animais alimentados com dieta controle não apresentaram diferença no peso corpóreo (Figura 28).

Figura 27: Peso (média $\pm$ epm) dos animais alimentados com dieta rica em gordura. Note que os animais que receberam Losartan tiveram o peso igual ao dos animais com três cópias do gene da ECA alimentados com dieta rica em gordura.

Figura 28: Peso (média $\pm$ epm) dos animais alimentados com dieta controle. Note que os animais tiveram o peso igual independente do número de cópias do gene da ECA.

3.6. Peso de tecido adiposo periepídidimo.

Em concordância com os resultados obtidos nos camundongos não diabéticos, o peso do tecido adiposo periepídidimo dos animais alimentados com dieta rica em gordura e com 3 cópias do gene da ECA foi menor do que o dos animais com 1 e 2 cópias do gene (Figura 29).

Figura 29: Peso do tecido adiposo periepídidimo (média ± epm) dos animais alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

3.7. Consumo de comida.

Quando analisamos o consumo de comida dos animais, verificamos que surpreendentemente os animais com 3 cópias do gene da ECA alimentados com dieta controle tiveram um consumo de comida maior do que os animais com 1 cópia do gene (Figura 30). Já no grupo alimentado com dieta rica em gordura não houve diferença no consumo de comida entre os animais com diferentes números de cópias do gene da ECA (Figura 31).

Figura 30: Consumo médio de comida dos animais alimentados com dieta controle em grama. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

Figura 31: Consumo médio de comida em 24 horas dos animais alimentados com dieta rica em gordura. Os números 1, 2 e 3 representam o número de cópias do gene da ECA.

3.8. Atividade da ECA.

Verificamos que a atividade da ECA nos rins foi diretamente correlacionada com o número de cópias do gene da ECA, mas esta não sofreu influência do tipo de dieta ao qual os camundongos foram submetidos (Figura 32).

Figura 32: Atividade da ECA em homogenato de rim dos animais alimentados com os dois tipos de dieta. Note que na dieta rica em gordura a atividade da ECA é menor do que na dieta controle, porém esta diferença só é estatisticamente significante nos animais com 2 cópias do gene da ECA.

3.9. Painel peptídico.

Coletamos e extraímos peptídeos de 5 amostras de tecido adiposo e do cérebro dos animais com 1, 2 ou 3 cópias do gene da ECA.

Para a análise do painel peptídico, utilizamos a enzima ep24.15 inativa para fazer gel filtração em coluna Sephadex G25 (figura 33). Como ainda não possuíamos quantidade suficiente de ECA inativa para fazer o experimento, usamos a ep24.15, que compartilha um grande número de substratos em comum com a ECA³³. No perfil de peptídeos encontrado no HPLC notamos que a ep24.15 inativa desloca os peptídeos do tecido adiposo (figura 33) e que os padrões de picos diferem entre os animais com 1, 2 e 3 cópias do gene da ECA.

As seqüências peptídicas encontradas no tecido adiposo dos animais com 3 cópias do gene da ECA e que diferiram dos animais com 1 cópia foram:

Número	MW	Seqüência	BLAST
1	1555	LNETGDEPFQYKN	Gln synthetase
2	1202	DITADDEPLT	Similar to Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
3	918	YKLLEPR	40S ribosomal protein S16
4	1057	YDEIKKYV	Solute carrier family 25, member 4 [Rattus norvegicus]
5	844	LTLR TKL	cDNA sequence BC029157 [Mus musculus]
6	1473	LSSDIAGVKE	Seqüência parcial
7	1479	EMTDVLSAEDIKK	Não Identificada
8	2106	LSSDL	Seqüência parcial
9	1634	AEFDKAAEEV	Seqüência parcial
10	1989	YSVNV	Seqüência parcial
11	1535	LTADC	Seqüência parcial

Experimento: Tecido Adiposo (TA) com a enzima 24.15 inativa ($5,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$ estoque) - $15\mu\text{l}$ de enzima ($10,7\mu\text{M}$) e $30\mu\text{l}$ do TA bruto ($100\mu\text{l}$ de volume final). Incubado por 30min à temperatura ambiente.

1 cópia alimentado com dieta rica em gordura

2 cópias alimentado com dieta rica em gordura

3 cópias alimentado com dieta rica em gordura

Figura 33: Perfil dos peptídeos após a passagem pela coluna de Sephadex G25. Em preto o controle negativo (peptídeos sem incubar com a enzima), em vermelho perfil de peptídeos após incubar com a ep24.15 inativa.

3.10. Dados Populacionais.

Em concordância com os resultados obtidos nos camundongos alimentados com dieta rica em gordura, na população de Vitória notamos que analisando as pessoas obesas e diabéticas tipo 2 (fenótipo semelhante aos camundongos alimentados com dieta rica em gordura), existe uma correlação entre o genótipo do polimorfismo da ECA e a porcentagem de gordura. Pessoa que tem o genótipo II tem a porcentagem de gordura significativamente maior, assim como os camundongos com 1 cópia do gene da ECA tem o peso e a porcentagem de gordura maior (Figura 34).

Figura 34: Note que a presença do alelo D foi significativamente associada com a diminuição na porcentagem de gordura somente nos indivíduos que pertenciam a um grupo de alto risco de desenvolver hiperinsulinemia.

VI. Discussão

Entre os inúmeros resultados deste estudo salientamos alguns que julgamos de grande relevância. Entre eles destaca-se a mortalidade decorrente do diabetes. Verificamos que a mencionada mortalidade é amplificada pelo número de cópias do gene da enzima conversora da angiotensina I e pela dieta rica em gordura. Desta forma, a associação entre fatores ambientais e mecanismos genéticos fica claramente estabelecida, pelo menos, no modelo estudado. A associação entre ambiente e genótipo também é evidenciada por outros resultados observados em verificações metabólicas e de atividade enzimática. Referimo-nos a redução da atividade da enzima conversora da angiotensina I no parênquima renal em resposta ao consumo de dieta rica em gordura. Um exemplo adicional é a influência da dieta rica em gordura sobre o peso corpóreo. Este efeito foi atenuado naqueles animais nos quais foram adicionados genes que codificam a ECA.

O entendimento dos mecanismos responsáveis pela interação genótipo e ambiente é de grande importância, uma vez que esta associação é parte integrante de inúmeras patologias de grande relevância para a saúde de populações. Referimo-nos a hipertensão arterial ⁵⁰, à obesidade ⁴⁸, ao diabetes mellitus ⁴⁹, às neoplasias de pele (REF.), etc.

Devido a amplitude dos objetivos deste estudo e à complexidade do assunto, inúmeros grupos experimentais e diversas variáveis foram avaliadas. Visando explorar os resultados de forma mais eficiente e compreensível a discussão foi dividida nos seguintes itens:

1. Camundongos geneticamente modificados com somente uma cópia do gene da ECA são menos susceptíveis ao desenvolvimento de complicações decorrentes do diabetes e de alimentação com uma dieta rica em gordura que é um modelo conhecido de resistência a insulina ². O oposto pode se conjecturar com relação aos camundongos geneticamente modificados, com três cópias do gene da ECA.
2. Fatores genéticos (cópias do gene da ECA) influenciam na regulação do peso frente a um estímulo ambiental como a *alimentação rica em gordura*.

3. A relação entre genótipo e fenótipo encontrado nos camundongos é comparável com relação semelhante encontrada em uma população humana.

Ainda antes da discussão dos resultados, seguem-se alguns comentários sobre os métodos utilizados. É importante ressaltar que no presente estudo, a indução de diabetes por STZ resultou em alterações metabólicas semelhantes às observadas em publicações de outros laboratórios^{27,44,51}. Observamos que os animais que receberam STZ tiveram uma significativa diminuição da insulinemia e um importante aumento da glicemia (Figuras 3, 4, 5, 11, 12, 13), além de poliúria e polidipsia (dados não apresentados), tanto naqueles animais alimentados com dieta normal quanto nos alimentados com dieta rica em gordura.

1. O gene da ECA como um gene que confere suscetibilidade a consequências do diabetes (camundongos submetidos a STZ).

Neste estudo obtivemos resultados que mostram fortes indícios de que o gene da ECA está intimamente ligado a consequências observadas no diabetes.

Os animais diabéticos foram divididos em dois grupos, os que receberam dieta controle e os que receberam dieta rica em gordura. Estes dois grupos apresentaram características distintas.

Os animais diabéticos não apresentaram diferença na pressão arterial quando comparados com os animais não diabéticos, independentemente da dieta. Além disso, o número de cópias do gene da ECA também não influenciou a pressão arterial, aparentemente desvinculando o SRA do controle da pressão neste modelo, confirmando achados de outros pesquisadores (Smithies O). A mudança endógena na atividade e expressão da enzima conversora de angiotensina I não está diretamente relacionada às alterações em outros elementos do SRA, por exemplo, existem dados na literatura mostrando que camundongos com 0, 1 e 2 cópias do gene da ECA tem níveis normais de angiotensina II⁵².

A glicemia está significativamente aumentada nos animais diabéticos, mas não foi influenciada pelo número de cópias do gene da ECA, tanto no grupo alimentado com dieta padrão quanto naquele que recebeu dieta com teor elevado de

gordura. Este fato não é contrário à associação genótipo e ambiente e já era esperado, uma vez que controlamos os níveis glicêmicos por meio de injeções suplementares de STZ aplicadas quando a glicemia baixava para valores inferiores a 200 mg/dL. No entanto, a insulina circulante dos animais com 3 cópias do gene da ECA é menor, tanto nos animais diabéticos quanto nos animais controle alimentados com dieta controle (Figura 13), indicando um possível efeito amplificador sobre a sensibilidade à insulina (relação entre insulina e glicose menor). Já nos animais diabéticos alimentados com dieta rica em gordura o quadro se inverte, os animais diabéticos com 3 cópias do gene da ECA tem a insulinemia significativamente aumentada quando comparados com os animais com 1 cópia, indicando uma redução na sensibilidade à insulina. Este fenômeno é muito interessante, pois mostra que dependendo do estímulo ambiental os fatores genéticos podem contribuir de maneiras totalmente opostas na determinação do fenótipo.

Alem de alterar a insulinemia e a glicemia, o diabetes também causou diminuição do peso, independentemente do número de cópias do gene da ECA, e da atividade da ECA renal, nos animais alimentados com dieta controle. Já nos animais diabéticos alimentados com dieta rica em gordura a atividade da ECA renal esta ligeiramente aumentada.

Não observamos lesões renais ou vasculares nos animais diabéticos alimentados ou não com dieta rica em gordura. Esta característica é confirmada por alguns outros estudos da literatura. Em um estudo desenvolvido por Huang et al (2001), diabetes foi induzido por STZ em camundongos fêmeas com 1, 2 ou 3 cópias do gene da ECA. Após 12 semanas de observação, estes autores também não observaram lesões renais à microscopia óptica. No entanto, foi verificado que os camundongos com 3 cópias tiveram albuminúria de 24 horas aumentada em relação aos camundongos com 1 e 2 cópias do gene da ECA, a partir de 6 semanas de diabetes. Isto indica um início de lesão de endotélio glomerular que não pode ser quantificada morfometricamente.

A maior mortalidade dos camundongos diabéticos com três cópias do gene da ECA é um dado muito interessante e que dá suporte à hipótese de que o gene que codifica a ECA é um fator de susceptibilidade a eventos cardiovasculares, uma vez que não foram encontradas lesões vasculares e renais e não houve modificações na

pressão arterial e no peso corpóreo. Os camundongos diabéticos com 3 cópias do gene da ECA tiveram maior taxa de mortalidade do que os camundongos com 1 cópia do gene nas duas dietas (Figuras 7 e 17; tabelas 3 e 4). Além disso, a mortalidade dos camundongos com 1 e 2 cópias do gene da ECA aparentemente foi mais tardia em comparação com os camundongos com 3 cópias, indicando que o gene da ECA confere maior susceptibilidade à mortalidade associada ao diabetes. Existem inúmeras causas de morte associada ao diabetes descompensado (modelo de diabetes por STZ), entre elas, cetoacidose, infecção generalizada, acidente vascular cerebral e morte súbita por parada cardíaca. No nosso estudo não identificamos a causa de morte dos camundongos, uma vez que o projeto não foi desenhado para isto. No entanto, podemos explorar algumas hipóteses explicativas para a mencionada maior mortalidade do diabetes em animais com três cópias do gene da ECA.

Primeiramente é importante ressaltar mais uma vez que a gravidade do diabetes avaliada pelo controle glicêmico e por outros indicadores não diferiu entre os camundongos com 1, 2 e 3 cópias do gene da ECA. Todos os grupos apresentaram a mesma glicemia (a cima de 200mg/dL) aumentada, o mesmo peso e a mesma pressão arterial.

Existem evidências mostrando que a alta concentração plasmática de ácidos graxos livres e de insulina são indicadores de maior risco de morte súbita⁵³ por arritmias. A concentração elevada de ácidos graxos livres circulantes é uma característica do diabetes⁵⁴. Se esta característica é amplificada por um maior número de genes codificadores da ECA é uma incógnita ainda não resolvida. A concentração plasmática de insulina está aumentada nos camundongos diabéticos alimentados com dieta rica em gordura e com 3 comparado com os de 2 (apesar de não ter atingido significância estatística) e de 1 cópia do gene da ECA. A mortalidade também foi maior nos animais diabéticos com três cópias do gene da ECA alimentados com dieta controle. Nestes animais, não ocorreu uma elevação da insulinemia. Pelo contrário, a insulina circulante foi numericamente menor do que nos animais com 2 e 1 cópia do gene da ECA. Tal fato indica que a sensibilidade à insulina no grupo 3 cópias de animais diabéticos que consomem dieta controle é maior. Espera-se nestas circunstâncias uma menor concentração de ácidos graxos

livres circulantes^{55,56}. Dito isto, neste grupo de animais, aparentemente a insulina e os ácidos graxos não são explicação para a maior mortalidade. O mecanismo responsável pelo incremento de mortalidade neste grupo é desconhecido devendo ser matéria de estudos adicionais.

É importante ressaltar neste ponto que é um conjunto de fatores que levam os camundongos diabéticos à morte, mas o fator genético (número de cópias do gene da ECA) é determinante para a diferenciação da mortalidade entre os diversos grupos de camundongos avaliados neste estudo. Isto mostra que o gene da ECA é um gene que confere susceptibilidade a mortalidade associada ao diabetes.

2. A influência do número de cópias do gene da ECA sobre a regulação do peso corpóreo em camundongos não-diabéticos.

Por muito tempo, o sistema renina-angiotensina vem sendo relacionado a doenças cardiovasculares^{35,36}, a distúrbios de memória e de comportamento^{37,38} e a outras patologias. Contudo, o mecanismo pelo qual o SRA influencia estas patologias continua desconhecido. Neste trabalho nós tentamos elucidar o mecanismo pelo qual a enzima conversora de angiotensina I influencia a regulação do peso.

O peso corpóreo somente foi menor em camundongos com três cópias do gene codificador da ECA e alimentados com dieta rica em gordura. Na mensuração do consumo de dieta foi observado que estes animais consumiam quantidade igual de ração quando comparados aos de 2 e 1 cópia do gene da ECA. Isto indica três possibilidades de mecanismos atuantes. A primeira é uma termogênese intrínseca maior (peso menor e consumo igual), a segunda é uma maior termogênese decorrente maior atividade motora espontânea e a terceira é uma redução na absorção intestinal de nutrientes.

O peso corpóreo dos animais com 3 cópias do gene da ECA e alimentados com dieta controle, não diferiu do peso corpóreo dos grupos com uma e com duas cópias do gene da ECA. Deve ser ressaltado, no entanto, que o consumo de ração dos camundongos com três cópias do gene da ECA, não-diabéticos e alimentados com dieta normal foi maior do que em animais com uma ou com duas cópias deste gene. O conjunto destes dados dá suporte aos mecanismos retro-mencionados.

A análise das glicemias e insulinemias permite afirmar que os animais com três cópias do gene da ECA, alimentados ou não com dieta rica em gordura têm maior sensibilidade à insulina quando comparados aos animais com duas e uma cópia do mencionado gene. Este fenômeno é mais evidente nos grupos alimentados com dieta rica em gordura. A sensibilidade à insulina é um fator que regula o peso corpóreo ^{18,19,20}. Como esta variável é possivelmente associada com o número de cópias do gene da ECA, pode-se conjecturar que o genótipo é fator determinante do peso corpóreo no modelo estudado.

A princípio, podemos conjecturar que o menor peso corpóreo e a maior sensibilidade à insulina nos animais com 3 cópias do gene da ECA seria devido ao aumento de angiotensina II no SNC e no tecido adiposo. A ação da angiotensina II sobre o receptor AT1 aumentaria o metabolismo e conseqüentemente diminuiria o peso, como já demonstrado em animais que receberam infusão crônica deste peptídeo ⁴¹. Contudo, se observarmos os resultados dos animais que receberam inibidor do receptor de angiotensina II (Losartan), nota-se que não houve nenhum efeito sobre o peso corpóreo. Isto sugere que a relação do aumento da atividade da ECA com o metabolismo não seja devida ao estímulo da angiotensina II sobre o receptor AT1. Isto nos leva a crer que outros substratos da ECA possam agir no controle metabólico dos animais, ou ainda outros componentes do sistema renina-angiotensina possam ter um efeito no sentido de aumentar o metabolismo dos animais com mais cópias do gene da ECA.

A leptina e a insulina, dois hormônios peptídicos, têm uma importância fundamental na regulação do peso corpóreo ^{20,21}. A leptina e a insulina agem no hipotálamo desencadeando uma seqüência de eventos que resulta na inibição do consumo de comida e no aumento do gasto de energia. Nesta cadeia de eventos, inúmeros neuropeptídeos estão envolvidos [neuropeptídeo Y, hormônio estimulatório de melanócito- α (α -MSH), cocaína, regulador de transcrição de anfetamina (CART), interleucina 1β e melanocortinas (MC)] ²⁰. Estes peptídeos são formados e regulados por peptidases que se localizam no cérebro, entre elas a ep24.15, ep24.16, NEP, ep24.11 e a enzima conversora de angiotensina I ^{33,39,40}.

Neste sentido isolamos os peptídeos do tecido adiposo e do cérebro dos animais com 1, 2 e 3 cópias do gene da ECA e, utilizando o método das proteínas

magnéticas (descrito em métodos), isolamos os substratos da ECA. Em uma primeira análise por HPLC notamos que os animais com 3 cópias do gene da ECA têm menos peptídeos substratos da ECA do que os animais com 1 cópia. Isto é concordante com a idéia de que o aumento da atividade da ECA estimula a degradação dos seus substratos. Em uma segunda análise por espectrometria de massa identificamos as seqüências destes peptídeos que são possíveis substratos da ECA. A reação da ECA sobre estes substratos pode reduzir fatores responsáveis por incremento ou gerar produtos responsáveis pela redução do peso corpóreo nos camundongos com 3 cópias do gene da ECA. Em um futuro trabalho seria interessante analisar o efeito de cada peptídeo identificado sobre o metabolismo dos camundongos.

Revisando a literatura a respeito dos animais “knockout” e “knockin” para os genes componentes do sistema renina-angiotensina (biblios), verificamos que o animal “knockout” para angiotensinogênio é o único que reproduz parcialmente o fenótipo encontrado no nosso estudo (com relação ao fatores envolvidos na regulação do peso corpóreo). Em animais “knockout” para o gene do angiotensinogênio (biblio - Endocrinology, December 2001), observou-se que quando estes eram alimentados com dieta rica em gordura, apresentavam menor peso, quantidade de gordura periepídidimal e insulinemia e maior atividade motora. Além disso, é sabido que o angiotensinogênio altera o comportamento em humanos e em camundongos agindo diretamente no sistema nervoso central (biblio alexandrinho + camun). Pode-se conjecturar que em resposta a um aumento da atividade da ECA há uma diminuição na produção de angiotensinogênio por “feedback” negativo. Por tanto, o efeito observado nos camundongos com 3 cópias do gene da ECA (menor peso, insulinemia e gordura periepídidimal) pode ser consequência de um efeito indireto da diminuição na produção de angiotensinogênio nestes animais. Resta então em uma etapa seguinte do nosso trabalho verificar os níveis de angiotensinogênio no nosso modelo.

Complementando os resultados encontrados no nosso modelo, um estudo desenvolvido no nosso Laboratório com 1600 indivíduos da população da cidade de Vitória, ES correlacionou o polimorfismo I/D da ECA, com a porcentagem de gordura corpórea. Notou-se que em indivíduos obesos e diabéticos tipo 2 (indivíduos correspondentes aos animais alimentados com dieta rica em gordura) a porcentagem

de gordura foi menor naqueles com genótipo DD e ID. Estes genótipos estão associados com maior atividade da ECA, correspondendo aos camundongos com três cópias do gene da ECA. (Figura 34).

Os resultados apresentados acima são consistentes com a sugestão de que o gene da ECA é um importante fator na resposta do organismo frente a um estímulo ambiental, como a dieta rica em gordura, modelo de diabetes tipo 2.

VI. Conclusão

Em conjunto, os resultados deste trabalho dão suporte a hipótese geral de que o gene da ECA confere susceptibilidade aumentada a eventos fisiopatológicos associados ao diabetes experimental.

Mais especificamente demonstramos que:

1. Camundongos geneticamente modificados com somente uma cópia do gene da ECA são menos susceptíveis ao desenvolvimento de complicações decorrentes do diabetes e de alimentação com uma dieta rica em gordura que é um modelo conhecido de resistência a insulina ². O oposto ocorre com os camundongos geneticamente modificados, com três cópias do gene da ECA.
2. Fatores genéticos (cópias do gene da ECA) influenciam na regulação do peso frente a um estímulo ambiental como a *alimentação rica em gordura*.
3. A relação entre genótipo e fenótipo encontrado nos camundongos é comparável com a relação encontrada na população de Vitória.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conn PM, Melmed S (1997). Endocrine Function of the Pancreas & the Regulation of Carbohydrate Metabolism. In: Conn PM, Melmed S (Editor), *Endocrinology Basic and Clinical Principles*. Hinmana Press, Totowa, NJ, USA.
2. Roberts CK, Vaziri ND, Liang KH, Barnard RJ: Reversibility of Chronic Experimental syndrome X by Diet Modification. *Hypertension* 2001; 37: 1323 - 1328.
3. Epstein M, Sowers JR: Diabetes Mellitus and Hypertension (Brief review). *Hypertension* 1992; 19: 403 – 418.
4. Unger RH, Foster DW: Diabetes Mellitus. *Williams (text book)* 199X; 21: 973 – 1059.
5. Savage PJ: Cardiovascular Complications of Diabetes Mellitus: What We Know and What We Need to Know about Their Prevention. *Ann Intern Med* 1996; 124: 123 – 126.
6. Lawn RM: Lipoprotein(a) in Heart Disease. *Scientific American* 1992; June: 26 – 126.
7. Voet D, Voet JG (1995): Lipid-Linked Proteins and Lipoproteins. In: Voet D, Voet JG (Editor), *Biochemistry*. John Wiley & Sons, NY, USA.
8. Brown M, Goldstein JL: How LDL Receptors Influence Cholesterol and Atherosclerosis. *Sci Am* 1984; 251(5): 58 – 66.
9. Fujihara CK, Padilha RM, Zatz R: Glomerular Abnormalities in Long – Term Experimental Diabetes. *Diabetes* 1992; 41: 286 – 293.
10. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Norman RA: Arterial Pressure Regulation Overriding Dominance of the Kidneys in Long-Term Regulation and Hypertension. *Am J Med* 1972; 52: 584-594.
11. Conn PM, Melmed S (1997). Endocrine Function of the Kidneys, Heart, & Pineal Gland. In: Conn PM, Melmed S (Editor), *Endocrinology Basic and Clinical Principles*. Hinmana Press, Totowa, NJ, USA.
12. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, Wfite MF, Saad MJ, Kahn CR: Cross-talk Between the Insulin and Angiotensin Signaling Systems. *Proc. Natl Acad Sci* 1996; 93: 12490 - 12495.

13. Panahloo A, Andrs C, Mohamed – Ali V, Gould MM, Talmud P, Humphries SE, Yudkin JS: The Insertion Allele of the ACE Gene I/D Polymorphism A Candidate Gene for Insulin Resistance?. *Circulation* 1995; 92: 3390 – 3393.
14. Correa – Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME: Renin and Angiotensinogen Gene Expression in Experimental Diabetes Mellitus. *Kidney Int* 1992; 41: 796 – 804.
15. Iimura O, Shimamoto K, Matsuda K, Masuda A, Takizawa H, Higashiura K, Miyazaki Y, Hirata A, Ura N, Nakagawa M: Effect of Angiotensin Receptor Antagonist and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor on Insulin Sensitivity in Fructose-Fed Hypertensive Rats and Essential Hypertensives. *Am J Hypertens* 1995; 8:353-357.
16. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T: Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2001; 108:1001-1013.
17. Kopelman PG: Obesity as medical problem. *Nature* 2000; 404:635-643.
18. Friedman JM: Obesity in the millennium. *Nature* 2000; 404:632-634.
19. Barsh GS, Farooqi IS, O’Rahilly S: Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000; 404:644-651.
20. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404:661-671.
21. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D: Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews* 1992; 13:387-414.
22. Lowell BB, Spiegelman BM: Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000; 404:652-660.
23. Zorad S, Fickova M, Zelezna B, Macho L, Kral JG: The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen Physiol Biophys* 1995; 14(5):383-391.
24. Shuldiner AR: Molecular Medicine Transgenic Animals. *N Eng J Med* 1996; 334: 653-655.

25. Smithies O: Theodore Cooper Memorial Lecture. A mouse view of hypertension. *Hypertension* 1997; 30(6): 1318-24.
26. Gershon D: Structural genomics—from cottage industry to industrial revolution. *Nature* 2000; 408: 273-274.
27. Lou J, Quan J, Tsai j, Hobensack CK, Sullivan C, Hector R, Reaven GM: Nongenetic Mouse Models of Non – Insulin – Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism* 1998; 47(6): 663 – 668.
28. Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Ezaki O: High – Fat Diet – Induced Hyperglycemia and Obesity in Mice: Differential of Dietary Oils. *Metabolism* 1996; 45(12): 1539 – 1546.
29. Kregel JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995; 375(6527): 146-148.
30. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 1987;162:156-159.
31. Apostol TM (1997). Average value of a function. In: Apostol TM, *Calculus (Volume I: 117)*. John Wiley & Sons, New York, USA.
32. Tanner, M (1996). *Tools for Statistical Inference*. Third Edition. Springer-Verlag.
33. Rioli V, Gozzo FC, **Heimann AS**, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, Almeida PC, Hyslop S, Eberlin MN, Ferro ES. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8547-55
34. Che F, Yan L, Li H, Mzhavia N, Devi LA, Fricker LD. Identification of peptides from brain and pituitary of Cpe^{fat}/Cpe^{fat} mice. *PNAS* 2001; 98(17):9971-9976.
35. Hirsch AT, Pinto YM, Schunkert H, Dzau VJ. Potential role of the tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1990; 66(11):22D-32D.
36. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin system. Their role in cardiovascular disease. *Circulation* 1993; 87(5Suppl):IV7-13.

37. Okuyama S, Sakagawa T, Sugiyama F, Fukamizu A, Murakami K. Reduction of depressive-like behavior in mice lacking angiotensinogen. *Neuroscience Letters* 1999; 261: 167-170.
38. Meira-Lima IV, Pereira AC, Mota GF, Krieger JE, Vallada H. Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and the risk of bipolar affective disorder in humans. *Neurosci Lett*. 2000;293 (2):103-106.
39. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277(17): 14838-14843.
40. Georgiadis D, Beau F, Czarny B, Cotton J, Yiotakis A, Dive V. Role of two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin. *Circ Res* 2003;93:148-154.
41. Porter JP, Anderson JM, Robison RJ, Phillips AC. Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. *Brain Research* 2003; 959:20-28.
42. Caron KMI, James LR, Kim H, Morham SG, Lopez MLSS, Gomez RA, Reudelhuber TL, Smithies O A genetically clamped renin transgene for the induction of hypertension. *PNAS* 2002; 99(12):8248-8252.
43. Kregge JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O: A Noninvasive Computerized Tail-Cuff System for measuring Blood Pressure in Mice. *Hypertension* 1995; 25: 1111-1115.
44. Kunjathoor VV, Wilson DL, LeBoeuf RC: Increased Atherosclerosis in Streptozotocin – induced Diabetes Mice. *J Clin Invest* 1996; 97: 1767 – 1773.
45. Vranes D, Cooper ME, Dilley RJ: Angiotensin – Converting Enzyme Inhibition Reduces Diabetes – Induced Vascular Hypertrophy: Morphometric Studies. *J Vasc Res* 1995; 32: 183 – 189.
46. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA: Quantitative Assessment of Atherosclerotic Lesions in Mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231 – 240.
47. Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Ezaki O: High – Fat Diet – Induced Hyperglycemia and Obesity in Mice: Differential of Dietary Oils. *Metabolism* 1996; 45(12): 1539 – 1546.

48. Kopelman, PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-643.
49. Zimmet P, Shaw J, Alberti KG. Preventing Type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. *Diabet Med.* 2003; 20(9):693-702. Review.
50. Sesso HD, Chen RS, L'Italien GJ, Lapuerta P, Lee WC, Glynn RJ. Blood pressure lowering and life expectancy based on a Markov model of cardiovascular events. *Hypertension.* 2003 ;42(5):885-90.
51. Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair M, Krege JH, Meneton P, Marre M, Smithies O, Alhenc-Gelas F. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *PNAS* 2001; 98(23): 13330–13334.
52. Wei C, Tian B, Perry G, Meng QC, Chen Y, Oparil S, Dell'Italia LJ. Differential ANGII generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of ACE gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282:H2254-H2258.
53. Jouven , Charles M, Desnos M, Ducimetière P. Circulating Nonesterified Fatty Acid Level as a Predictive Risk Factor for Sudden Death in the Population. *Circulation.* 2001;104:756-761.
54. Balkau B, Jouven X, Ducimetière P, Eschwège E. Diabetes as a risk factor for sudden death. *THE LANCET* . 1999; 354: 1968-1969.
55. Gasteyger C, Tremblay A. Metabolic impact of body fat distribution. *J Endocrinol Invest.* 2002 Nov;25(10):876-83. Review.
- 56.2: Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002 Sep;5(5):545-9. Review.