

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS

BRUNA CAPRIOLI

Análise das alterações fenotípicas e metabólicas de animais com deleção do gene da neurolisina (EC 3.4.24.16), em modelo de obesidade induzida por dieta

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

São Paulo, 2023

BRUNA CAPRIOLI

Análise das alterações fenotípicas e metabólicas de animais com deleção do gene da neurolisina (EC 3.4.24.16), em modelo de obesidade induzida por dieta

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

Área de concentração:
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho
Ferro

Versão
original.

São Paulo, 2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Caprioli, Bruna
Análises das alterações fenotípicas e metabólicas
de animais com deleção do gene da neurolisina (Nln-/-
) em modelo de obesidade induzida por dieta /
Bruna Caprioli; orientador Emer Suavinho Ferro. --
São Paulo, 2023.
48 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Obesidade. 2. Metabolismo energético. 3.
Oligopeptidases. 4. Neurolisina. 5. Peptídeos
intracelulares. I. Suavinho Ferro, Emer,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Bruna Caprioli

Título da Dissertação: Análise das alterações fenotípicas e metabólicas de animais com deleção do gene da neurolisina (EC 3.4.24.16), em modelo de obesidade induzida por dieta

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

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

Aprovada

Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise das alterações fenotípicas e metabólicas dos animais knockout para a neurolisina (Nln -/-) em modelo de obesidade induzida por dieta", protocolada sob o CEUA nº 4112010621, sob a responsabilidade de **Emer Suavinho Ferro e equipe; Bruna Caprioli; Rosangela Aparecida dos Santos Eichler; Mayara Calegari Ferrari Gewehr; Renee de Nazaré Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 22/09/2021.

We certify that the proposal "Phenotypic and metabolic analysis of neurolysin knockout mice (Nln - / -) in a diet-induced obesity model.", utilizing 20 Genetically modified mice (GMO) (10 males and 10 females), 20 Isogenics mice (10 males and 10 females), protocol number CEUA 4112010621, under the responsibility of **Emer Suavinho Ferro and team; Bruna Caprioli; Rosangela Aparecida dos Santos Eichler; Mayara Calegari Ferrari Gewehr; Renee de Nazaré Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/22/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [24 meses](#)

Depto/Setor: [Farmacologia](#)

Origem:	Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade II		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 8 a 12 semanas
Linhagem:	Nln	N amostral:	10
Origem:	Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade II		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 8 a 12 semanas
Linhagem:	Nln	N amostral:	10
Origem:	Biotério Central FMUSP		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 8 a 12 semanas
Linhagem:	C57BL6	N amostral:	10
Origem:	Biotério Central FMUSP		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 8 a 12 semanas
Linhagem:	C57BL6	N amostral:	10

São Paulo, 19 de janeiro de 2022



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro, pela excelente orientação do projeto, constante atenção, carreira científica exemplar e sempre amigável relação.

À Dra. Rosangela A. S. Eichler, informalmente minha co-orientadora nessa dissertação de mestrado, pela co-orientação e ajuda nas mais diversas fases desse trabalho.

Às meninas/mulheres/amigas Mayara, Renée, Rosângela, Patrícia, Maylin, Karina, Thayná e Andressa pela parceria, compartilhamento de conhecimento, experiências boas e ruins e risadas.

Aos professores do departamento de Farmacologia do ICB em geral pelas disciplinas que cursei, por aprimorarem o entendimento dos alunos em Farmacologia, por todo o conhecimento e discussões pertinentes e profundas compartilhados sobre o uso de animais. À secretaria por toda atenção e apoio prestado.

Aos meus pais Geraldo e Alexandra e irmãs Carolina e Beatriz (*in memoriam*) pelo sempre presente interesse e admiração que impulsionam.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), CAPES, Instituto de Ciências Biomédicas e Universidade de São Paulo pela oportunidade da bolsa e investimento nos 02 anos de projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A endo-oligopeptidase neurolisina (E.C.3.4.24.16; Nln) foi primeiro identificada em membranas sinápticas de cérebro de ratos, como uma peptidase com habilidade para hidrolisar a ligação Pro-Tyr inativando o neuropeptídeo neurotensina. Estudos subsequentes demonstraram que a Nln, recombinante e homogeneamente purificada, tem capacidade para hidrolisar diversos outros neuropeptídeos, incluindo peptídeos opioides, angiotensina e bradicinina. O desenvolvimento de camundongos C57BL6 com supressão da expressão gênica da Nln (Nln^{-/-}), permitiram anteriormente avaliar a relevância biológica dessa enzima no metabolismo energético. O principal papel sugerido para a Nln no metabolismo energético, utilizando os animais Nln^{-/-}, foi de aumentar a sensibilidade à insulina e induzir maior captação de glicose. O mecanismo molecular sugerido para essa característica metabólica dos animais Nln^{-/-} envolve a participação de peptídeos intracelulares (InPeps), que nesses animais podem estar modulando a interação proteína-proteína (IPP) e a expressão de genes relacionados ao controle do metabolismo energético. Neste projeto, os animais Nln^{-/-} e seus respectivos controles (animais C57BL6 selvagens; WT), machos e fêmeas (n = 5-8), foram alimentados com uma dieta padrão (DP) ou hipercalórica suplementada com leite condensado (DH) durante 8 semanas. Todos os animais e procedimentos utilizados foram aprovados pela CEUA ICB, de acordo com as normas estabelecidas pelo CONCEA (protocolo nº 4112010621). Foram avaliados a massa corporal, consumo de ração, calorias e água, a massa dos tecidos adiposos, hepático e muscular, a captação de glicose (TTG), a sensibilidade à insulina (TTI), a histologia do fígado, a expressão de diversos genes no tecido adiposo retroperitoneal, e o peptidoma no tecido adiposo gonadal. Os animais Nln^{-/-} ou WT, machos e fêmeas (n = 5-8), alimentados com DP tiveram semelhantes: a) consumo de ração, calorias e água, b) ganho de massa corporal, c) tolerância à glicose, d) resistência à insulina, e) insulina plasmática, f) massa dos tecidos adiposos gonadal e retroperitoneal, g) massa do músculo estriado esquelético gastrocnêmico, e h) massa do fígado.

Quando os animais Nln^{-/-} e WT, machos e fêmeas (n = 5-8), foram alimentados com DH houve distinção na massa corporal, com maior ganho observado para os animais Nln^{-/-} (machos e fêmeas). Os animais WT e Nln^{-/-}, machos e fêmeas, alimentado(a)s com DH, tiveram um menor consumo de ração, comparados aos respectivos controles alimentados com DP. Alimentados com DH os animais Nln^{-/-}, tanto machos como fêmeas, tiveram um consumo de ração maior que os animais WT. Estes dados sugerem que os animais Nln^{-/-} alimentados com DH podem ter ganho maior de massa corpórea em decorrência do maior consumo calórico. Os animais Nln^{-/-} (fêmeas) tiveram maior tolerância à glicose, bem como maior ganho de massa dos tecidos adiposos gonadal e retroperitoneal, bem como redução na massa do fígado (fêmeas e machos) comparados aos respectivos controles WT. Utilizando os animais alimentados com DP como referencial, houve alterações significativas na expressão de genes relacionados ao metabolismo energético do tecido adiposo retroperitoneal, tanto nos animais WT como Nln^{-/-}, quando alimentados com DH. As alterações (tanto aumento como diminuição) nos níveis relativos de peptídeos intracelulares específicos que ocorreram entre animais Nln^{-/-} comparados aos WT, se deram de maneira independente da dieta. Considerando que os animais Nln^{-/-} (machos e fêmeas) apresentaram maior consumo calórico comparados aos animais WT, quando alimentados com DH, é possível sugerir a participação da Nln nos mecanismos relacionados à ingesta alimentar e à regulação do metabolismo de gordura nos tecidos adiposos investigados. A alteração na expressão de genes relacionados ao metabolismo energético e nos níveis relativos de InPeps específicos, sugerem um possível mecanismo molecular para o maior ganho de massa corporal e de tecidos adiposos. No entanto, estudos posteriores serão importantes para que se possa investigar o mecanismo molecular responsável pela maior ingesta e consequente maior ganho de massa corporal dos animais Nln^{-/-}.

Palavras-chave: Neurolisina. Tecido adiposo. Peptídeos intracelulares. Obesidade. Expressão gênica.

ABSTRACT

Analysis of phenotypic and metabolic changes in animals with deletion of the neurolysin gene (Nln^{-/-}) in a diet-induced obesity model.

Endo-oligopeptidase neurolysin (E.C.3.4.24.16; Nln) was first identified in rat brain synaptic membranes, as a peptidase with the ability to hydrolyze the Pro-Tyr bond inactivating the neuropeptide neurotensin. Subsequent studies demonstrated that Nln, recombinant and homogeneously purified, has the capacity to hydrolyze several other neuropeptides, including opioid peptides, angiotensin, and bradykinin. The development of C57BL6 mice with suppression of Nln gene expression (Nln^{-/-}) previously allowed the evaluation of the biological relevance of this enzyme in energy metabolism. The main role suggested for Nln in energy metabolism, using Nln^{-/-} animals, was to increase insulin sensitivity and induce greater glucose uptake. The molecular mechanism suggested for this metabolic characteristic of Nln^{-/-} animals involves the participation of intracellular peptides (InPeps), which in these animals may be modulating the protein-protein interaction (IPP) and the expression of genes related to the control of energy metabolism. In the present report, male and female Nln^{-/-} animals and their respective controls (wild C57BL6 animals; WT) (n = 5-8) were fed a standard (DP) or hypercaloric diet supplemented with condensed milk (DH) for 8 weeks. All animals were used and maintained with a certificate approved by CEUA ICB and standards established by CONCEA (protocol No. 4112010621). Herein, were evaluated the body mass, feed quantities, calories and water intake, adipose tissue, liver and muscle mass, glucose uptake (GTT), insulin sensitivity (ITT), liver histology, expression of several genes in retroperitoneal adipose tissue, and the peptidome in the gonadal adipose tissue. Nln^{-/-} or WT animals, male and female (n = 5-8), fed with DP had similar: a) food, calorie and water intake, b) body mass gain, c) glucose tolerance, d) insulin resistance, e) plasma insulin, f) gonadal and retroperitoneal adipose tissue mass, g) gastrocnemius skeletal muscle mass, and h) liver mass.

When male and female Nln^{-/-} and WT animals (n = 5-8) were fed DH, there was a difference in body mass, with greater gain observed for Nln^{-/-} animals (males and

females). WT and Nln^{-/-} animals, male and female, fed DH, had a lower food intake compared to the respective controls fed DP. Fed with DH, Nln^{-/-} animals, both males and females, had a higher food intake than WT animals. These data suggest that Nln^{-/-} animals fed DH may have greater body mass gain due to higher caloric intake. Nln^{-/-} animals (females) had greater glucose tolerance, as well as greater mass gain in gonadal and retroperitoneal adipose tissues, as well as a reduction in liver mass (females and males) compared to the respective WT controls. Compared to DP-fed animals, animals DH-fed presented significant changes in the expression of genes related to energy metabolism in retroperitoneal adipose tissue, both in WT and Nln^{-/-} animals. The changes (both increases and decreases) in the relative levels of specific InPeps that occurred between Nln^{-/-} animals compared to WT were independent of diet. Considering that Nln^{-/-} animals (males and females) had higher caloric intake compared to WT animals, when fed with DH, it is possible to suggest the participation of Nln in mechanisms related to food intake and the regulation of fat metabolism in the adipose tissues investigated. The alteration in the expression of genes related to energy metabolism and in the relative levels of specific InPeps, suggest a possible molecular mechanism for the greater gain in body mass and adipose tissues. However, further studies will be necessary to better understand the molecular mechanism responsible for the higher intake and consequent higher body mass gain observed in Nln^{-/-} animals.

Keywords: Neurolysin. Adipose tissue. Intracellular peptides. Obesity. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Imagem de gel de agarose evidenciando as bandas obtidas por PCR para identificar o genótipo de animais WT e $Nln^{-/-}$	30
Figura 2 - Ganho de massa corporal, entre as semanas 8 a 16, de camundongos machos (M) e fêmeas (F), selvagens (WT) ou knockout para a Nln ($Nln^{-/-}$), alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hipercalórica (DH).....	31
Figura 3 – Massa úmida dos fígados de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou knockout para a Nln ($Nln^{-/-}$), corrigido pela massa corporal dos animais (mg/g).....	34
Figura 4 – Cortes histológicos de fígado corados com hematoxilina e eosina (HE) dos animais machos (A) e fêmeas (B).....	35
Figura 5 – Massa úmida do tecido adiposo inguinal de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou knockout para a Nln ($Nln^{-/-}$), corrigido pela massa corporal dos animais (mg/g).....	36
Figura 6 – Massa úmida do tecido adiposo gonadal de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou knockout para a Nln ($Nln^{-/-}$), corrigida pela massa corporal dos animais (mg/g).....	37
Figura 7 – Massa úmida do tecido adiposo retroperitoneal de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou knockout para a Nln ($Nln^{-/-}$), corrigida pela massa corporal dos animais (mg/g).....	38
Figura 8 – Massa úmida do músculo gastrocnêmio de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou knockout para a Nln ($Nln^{-/-}$), corrigida pela massa corporal dos animais (mg/g).....	39
Figura 9 – Teste de tolerância à glicose em camundongos machos (A, C) e fêmeas (B, D). A e B, curvas glicêmicas, C e D, área sob as curvas glicêmicas, dos grupos selvagens (WT) ou Nln knockout ($Nln^{-/-}$) em dietas padrão (DP) ou hipercalórica (DH).....	40
Figura 10 – Teste de tolerância à insulina (TTI) em camundongos machos.....	41
Figura 11 – Avaliação quantitativa da insulina por teste de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	42
Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados para os experimentos de real-time PCR(RT-PCR).....	26
Tabela 2. Consumo de comida e água dos animais machos investigados nesse trabalho.	33
Tabela 3. Consumo de comida e água dos animais fêmeas investigados nesse trabalho.	33
Tabela 4. Níveis de expressão gênica no tecido adiposo retroperitoneal de camundongos machos WT e $Nln^{-/-}$ analisados por RT-PCR.	44

Tabela 5. Níveis de expressão gênica no tecido adiposo retroperitoneal de camundongos fêmeas WT e NIn ^{-/-} analisados por RT-PCR.	45
Tabela 6. Sequências de peptídeos presentes no tecido adiposo gonadal de machos WT ou NIn ^{-/-} , alimentados com DP ou DH.	47
Tabela 7. Sequências de peptídeos presentes no tecido adiposo gonadal de fêmeas WT ou NIn ^{-/-} , alimentados com DP ou DH.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK – Proteína quinase ativada por
AUC – Área sob a curva
BAT – Tecido adiposo marrom
β3AR – Receptor Adrenérgico beta 3
CD11c – Integrina alfa X
CD206 – Receptor de
manose
CD36 – Molécula CD36
DH – Dieta hiperlipídica
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM – Diabetes mellitus
DM2 – Diabetes mellitus tipo 2
DMH – Hipotálamo dorsomedial
DP – Dieta padrão
DPP4 – Dipeptidil peptidase 4
ECA – Enzima conversora de angiotensina
ELISA – Teste de imunoabsorção enzimática
ESMS – espectrometria de massas de aerossol de elétrons
F4/80 – Receptor de adesão E1 acoplado à proteína G
FABP4 – Proteína de ligação a ácidos graxos 4
HEK293 – Célula embrionária de rim humano 293
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
IMC – Índice de massa Corporal
IDE – Enzima degradadora de insulina

LC/MS/MS – Espectrometria de massa por aerossol de elétrons, acoplada à nano cromatografia de alta resolução em coluna C18 de fase reversa

LPL – Lipoproteína lipase

MHC-I – Complexo principal de histocompatibilidade de classe I

mm – milímetros

NEP – Neprilisina

Nln – Neurolisina

Nln^{-/-} - Camundongos C57BL6 com deleção da expressão gênica da Nln

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PGC1-alfa – Co-ativadores de transcrição gênica PGC-1

POP – Prolil Oligopeptidase

PPAR-alfa – Receptor ativado por proliferadores peroxissoma tipo *alfa*

PPAR-gama – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo *gama*

Prot-β5 – Subunidade beta 5 do proteassomo

RT-PCR – *Real-time* PCR

SNC – Sistema nervoso central

THOP1 – Thimet oligopeptidase

THOP1^{-/-} – Camundongos C57BL6 com deleção da expressão gênica para a THOP1

TTG – Teste de tolerância à glicose

TTI – Teste de tolerância à insulina

WAT – Tecido adiposo branco

WT – Camundongos C57BL6 selvagens

WHO – Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Obesidade e tecido adiposo.....	16
1.2	Proteínas e o sistema de degradação “ubiquitina-proteassoma”.....	18
1.3	Endo-oligopeptidase neurolisina e nosso modelo de estudo.....	19
2	OBJETIVO.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Animais.....	21
3.2	Indução da obesidade.....	22
3.3	Acompanhamento dos animais quanto a massa corporal, consumo de ração, calorias e água.....	22
3.4	Teste de tolerância à glicose e à insulina.....	23
3.5	Dosagem de insulina plasmática.....	24
3.6	Genotipagem de camundongos Nln ^{-/-}	24
3.7	PCR em tempo real (qRT-PCR).....	25
3.8	Análises histológicas.....	27
3.9	Peptidoma.....	27
3.10	Análises estatísticas.....	29
4	RESULTADOS.....	30
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÃO.....	57
7	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e tecido adiposo

Enquanto pouco menos de 4% das crianças e adolescentes de 5 a 19 anos estavam obesos em 1975, mais de 18% (aproximadamente 124 milhões) de crianças e adolescentes estavam obesos em 2016, ainda naquele ano mais de 39% (aproximadamente 1,9 bilhão) de adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso. No total, 13% da população mundial estavam obesos em 2016. Na África, o número de crianças menores de 5 anos com excesso de peso aumentou quase 24% desde 2000 e na Ásia, quase metade das crianças menores de 5 anos estavam com sobrepeso ou obesidade em 2019 (Organização Mundial da Saúde, 2019).

O desequilíbrio multifatorial dos mecanismos de homeostase que controlam o balanço energético (onde a aquisição de calorias é maior do que o gasto de energia) faz com que se desenvolva a obesidade. Esta consiste em uma doença crônica, com acúmulo anormal ou excessivo de gordura que se torna prejudicial à saúde(1). As principais causas da obesidade incluem suscetibilidade genética, deficiências na síntese e ação de leptina ou outros sinais provenientes dos hormônios gastrointestinais, defeitos nos sistemas neurais hipotalâmicos, defeitos nos sistemas que controlam as perdas de energia e diminuição dos gastos de energia metabólica e da termogênese(2). Outros fatores, sociais, financeiros, culturais, sedentarismo e qualidade da dieta, contribuem também para o desenvolvimento da obesidade(3). Atualmente ocorre um aumento do consumo de alimentos ultra processados geralmente ricos em gorduras hidrogenadas, carboidratos simples e baixos teores de carboidratos complexos(4), e também declínio do gasto de energia associado à falta de atividade física regular(5). O excesso de energia ingerida e não gasta acumula-se em gordura corporal, especialmente nos tecidos adiposo e hepático. Este

desequilíbrio representa uma das principais razões pelas quais as pessoas estão com sobrepeso e obesidade.

O tecido adiposo é um órgão dinâmico que pode variar de 4% a >40% da composição corporal total de humanos adultos. O tecido adiposo branco (WAT) é frequentemente conhecido por sua função de armazenar energia, e sua distribuição pode ser ocorrer na forma de depósitos subcutâneo e visceral. O tecido adiposo subcutâneo forma uma camada na hipoderme, enquanto o tecido adiposo visceral é subdividido em: a) omental, tecido adiposo que circunda superficialmente a região anterior do intestino; b) mesentérico, tecido adiposo mais profundo, que circunda a região posterior do intestino junto à coluna vertebral; c) retroperitoneal, localizado perto dos rins, na região dorsal da cavidade abdominal; d) gonadal, localizado ao redor das gônadas e dutos gonadais. Além desses dois principais depósitos (subcutâneo e visceral), há pequenos depósitos de tecido adiposo visceral no coração (tecido adiposo epicárdico), no estômago (tecido adiposo epigástrico) e nos vasos sanguíneos (tecido adiposo perivascular)(6). No entanto, os mamíferos também possuem o tecido adiposo marrom (BAT), que desempenha um papel crucial na homeostase energética através da termogênese(7-9). Evidências emergentes sugerem que os mamíferos possuem pelo menos dois tipos de adipócitos termogênicos: marrom clássico e bege(7). Em roedores e lactentes humanos, os adipócitos marrons clássicos estão localizados nas regiões interescapulares e ao redor do rim. Os adipócitos bege são uma forma induzível de adipócitos termogênicos que residem esporadicamente nos depósitos de tecido adiposo branco(10).

1.2 As proteínas e o sistema de degradação “ubiquitina-proteassoma”

As proteínas organizam, estruturam e garantem a sobrevivência dos seres vivos, interagem com outras moléculas, sendo fundamentais nos processos fisiológicos, como o transporte de oxigênio, a resposta imune, contração muscular e processos bioquímicos. Proteínas têm funções estruturais, embora muitas sejam enzimas que catalisam as diferentes reações químicas nas células(11, 12). O conceito de estabilidade das proteínas foi posteriormente substituído pela demonstração de um equilíbrio dinâmico, regulado por síntese e degradação, o que permite a remoção de proteínas anormais ou desnecessárias e das que atingiram o final da vida útil. Enzimas específicas que realizam este processo de hidrólise de ligações peptídicas digerindo proteínas, são chamadas de peptidases ou proteases, sendo, então, envolvidas na regulação de processos como replicação do DNA, regulação do ciclo e sinalização celular, neurotransmissão, respostas imune e inflamatória, morte celular programada apoptótica e outros processos importantes(13). No caso de proteínas intracelulares de seres eucariontes, a degradação de proteínas estranhas, virais, por exemplo, ou “envelhecidas” pode ser realizada pelo sistema ubiquitina-proteassoma, também conhecido como via de degradação extralissossomal(14). Uma cadeia da pequena de uma proteína altamente conservada, a ubiquitina, marca covalentemente as proteínas destinadas à degradação, e posteriormente a degradação efetiva é feita pelo megacomplexo proteolítico, de 1,2 MDa, do proteassoma(15, 16). A existência deste sistema faz com que, posteriormente à sua ação, sejam liberados no interior das células (núcleo e citoplasma) peptídeos que contém entre 2-21 aminoácidos (média de 10-12 aminoácidos)(14, 16). Para estes peptídeos produzidos existem destinações conhecidas, como: 1) apresentação para células CD8+ como antígenos associados ao complexo de histocompatibilidade de classe I(14, 17), 2) substratos para

aminopeptidases e posterior utilização dos aminoácidos livres na síntese de novas proteínas(17-19) e, 3) apresentação como substratos para peptidases intracelulares(20).

1.3 Endo-oligopeptidase neurolisina e nosso modelo de estudo

Pertencente à família das metalopeptidases, a neurolisina (EC 3.4.24.16; Nln), clonada em 1998(21) após sua identificação bioquímica em 1989(22-25), é encontrada em diferentes compartimentos intracelulares de neurônios encefálicos de ratos(26, 27), em maior parte no citosol, mas podendo também sofrer splicing alternativo e ser endereçada para as mitocôndrias(28). A conformação do seu sítio ativo permite o acesso de apenas peptídeos contendo entre 5-17 aminoácidos, por estar situado na base de um canal estreito e profundo, que molda sua especificidade por peptídeos bioativos sem estrutura secundária ou terciária desenvolvidas(29-31). Por análises bioquímicas *in vitro* é bem estabelecido que a Nln seja capaz de clivar uma série de peptídeos bioativos como, por exemplo, neurotensina, bradicinina, angiotensina, hemopressina, além de vários peptídeos opioides(23, 24, 32, 33). As análises imuno-histoquímicas para microscopia de luz e eletrônica indicaram que no cérebro de ratos, a Nln pode ser encontrada tanto em neurônios como em células da glia(26, 27). A função biológica da Nln ainda não foi completamente estabelecida, embora a Nln possa possuir papel ativo no controle da dor(34, 35), na regulação da pressão arterial(36), e no controle da glicemia plasmática(37).

Os resultados obtidos com a geração de um modelo animal com supressão da expressão gênica da Nln (Nln^{-/-}), sugerem que a deleção da sua expressão é compatível com a vida embrionária e adulta, e que os animais Nln^{-/-} não são visualmente distinguíveis dos animais selvagens (WT). Entre os animais Nln^{-/-} e WT

não há distinção na composição corporal (massa muscular e massa gorda), embora os animais $Nln^{-/-}$ mostrem uma leve, porém significativa, diminuição da massa corporal quando comparados com os animais WT(37). O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado em animais $Nln^{-/-}$ e WT para investigar a tolerância à glicose. Os valores da glicemia sanguínea medidos 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após uma dose alta de glicose intravenosa foram significativamente menores em animais $Nln^{-/-}$, quando comparados com os animais WT. Sendo assim, os animais $Nln^{-/-}$ se mostraram mais tolerantes à glicose quando comparados aos animais WT(37). Também foi realizado teste de tolerância à insulina (ITT) e a determinação da constante de decaimento da glicose (K_{ITT}), calculada a partir do teste de tolerância à insulina. Além disso, foram realizados ensaios de *Western blotting* avaliando a fosforilação da AKT, uma das bases moleculares envolvidas na sensibilidade à insulina(37). Os animais $Nln^{-/-}$ comparados aos animais WT apresentaram um aumento na sensibilidade à insulina, medida pelo ITT e K_{ITT} bem como pelo aumento nos níveis de fosforilação da AKT (um ponto chave na via de sinalização da insulina). Este último ocorreu tanto no músculo gastrocnêmico como no tecido adiposo epididimal, mas não no fígado(37). O teste de tolerância ao piruvato (um metabólito intermediário comum nas diversas vias gliconeogênicas, e pode ser formado tanto a partir do lactato como de aminoácidos ou glicerol), utilizado para estimar a capacidade de gliconeogênese hepática dos animais também foi realizado. Nestes testes, os animais $Nln^{-/-}$ apresentaram maior capacidade gliconeogênica, com uma maior produção de glicose a partir do piruvato(37). Genes como frutose 6-bifosfatase (Fbp1) e glicoquinase (Gck) que participam diretamente do processo de gliconeogênese no fígado foram testados, utilizando qPCR, e apresentaram uma maior expressão nos animais $Nln^{-/-}$ em relação aos animais WT(37).

As alterações metabólicas encontradas nos animais $Nln^{-/-}$ sugeriu que estudos adicionais sobre o papel metabólico dessa oligopeptidase poderiam ser realizados. Neste projeto, o modelo dos animais $Nln^{-/-}$ foi desafiado com a indução à obesidade mediante alimentação com uma dieta hipercalórica, e vários parâmetros metabólicos bem como o perfil peptídico foram avaliados no intuito de averiguar a possível associação da variação do perfil de InPeps com as alterações metabólicas induzidas pela ausência da neurolisina.

2. OBJETIVO

Avaliar comparativamente as alterações fenotípicas e metabólicas dos animais WT e $Nln^{-/-}$, em modelo de obesidade induzida por dieta, a fim de avançar no entendimento das funções biológicas e do envolvimento da Nln no metabolismo energético.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos a infraestrutura da Instalação Animal do Departamento de Farmacologia: Unidade II – Instalação de Camundongos, e do Laboratório de Farmacologia dos InPeps, localizados no Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Capital. Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA- ICB/USP) na reunião de 22/09/2021, sob o número CEUA nº 4112010621, estando de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas

pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Camundongos C57BL6/6N machos e fêmeas, WT, provenientes do Centro de Bioterismo (Rede USP de Biotérios), ou $Nln^{-/-}$, provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia, inicialmente com 8 semanas de vida, foram mantidos à 22°C, com ciclos escuros – claros fixos (12/12 horas), e receberam água/ração *ad libitum*.

3.2 Indução da obesidade

No modelo de obesidade induzida por dieta, aos grupos de animais WT e $Nln^{-/-}$ (n = 5-8), com 8 semanas de vida, foi oferecida semanalmente, durante 4 semanas, 100 g de ração padrão (DP) ou ração hiperlipídica suplementada com leite condensado (DH). O conteúdo calórico da DP era de 3,8 kcal/g (carboidrato, 70%; proteína, 20%; gordura, 10%; Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A., Colombo, PR, Brasil), enquanto da DH era de 5,3 kcal/g (carboidrato, 27,44%; proteína, 13,55%; gordura, 59%; Rhoster, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) suplementada *ad libitum* com 3,25 kcal/g de leite condensado (Moça, Nestlé, São Paulo, SP, Brasil; carboidrato 68%; proteínas 9%; gordura 23%), acrescido de 1% de complexo polivitamínico AIN-93 (Rhoster, Araçoiabada Serra, SP, Brasil)³⁶.

3.3 Acompanhamento dos animais quanto a massa corporal, consumo de ração, calorias e água

Semanalmente, os animais WT e $Nln^{-/-}$ foram pesados em uma balança convencional e o consumo de ração, calorias e água avaliados. A cada semana, a ração não ingerida que restava nas gaiolas foi pesada, e o valor subtraído da quantidade inicial de ração oferecida (massa da ração inicial — massa da ração

restante). O leite condensado foi colocado em um bebedouro com medida de volume e bico de aço inox com esfera, e ao final de cada semana o volume consumido era avaliado. O consumo de calorias foi calculado através da multiplicação do consumo da semana da DP por 3,8 kcal, e da DH por 8,55Kcal (correspondendo à soma de 5,3 kcal da ração + 3,25 kcal do leite condensado). O volume de água ingerido também era medido através da utilização de uma proveta de 1000 mL. Ao final dos tratamentos, os animais foram anestesiados com isoflurano e sacrificados por punção cardíaca. Os tecidos hepáticos, adiposos inguinal, retroperitoneal, e gonadal, bem como do músculo gastrocnêmico, foram retirados e pesados a fim de obter-se a massa úmida desses tecidos, que foram então armazenados em freezer -80°C até o momento de utilização. O valor da massa úmida dos tecidos foi corrigido pela massa corporal total dos animais, usando a seguinte equação: massa do tecido x 100/massa corporal do animal vivo.

3.4 Teste de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI)

Para melhor caracterizar o perfil metabólico desses animais, foram realizados os testes de tolerância à glicose (TTG) e de tolerância à insulina (TTI). Para ambos os experimentos, os camundongos foram previamente submetidos a jejum de 12 ou 4 horas, respectivamente. Amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, após a injeção intraperitoneal (i.p.) de solução de glicose (2 g/kg), quando realizado o TTG. No TTI, após a injeção de 0.75U/kg de insulina, as amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0, 4, 8 12,16. Nos dois ensaios, a glicemia foi mensurada utilizando um medidor de glicose (glicofitas; Accu-Check Performa, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

3.4 Dosagem de insulina plasmática

Para a dosagem de insulina plasmática dos animais WT e $Nln^{-/-}$, as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e a avaliação quantitativa da insulina foi realizada no plasma pelo teste de imunoadsorção enzimática (ELISA), usando o kit para dosagem de insulina em camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (EMD Millipore, Missouri, EUA).

3.6 Genotipagem de camundongos $Nln^{-/-}$

Os animais utilizados para os experimentos tiveram seus genótipos confirmados através da análise de PCR convencional, com o intuito de confirmar a deleção da Nln . As amostras de DNA foram extraídas da cauda de camundongos (3 a 4 mm que foram digeridos overnight a 55 °C com 50uL de tampão Tris 100mM, EDTA 5mM, NaCl 200 mM e SDS 0,2% contendo 80ug de proteinase K) e utilizadas para o ensaio com as seguintes sequências de oligonucleotídeos: pNlnF3 (5'CGCCTCCTGCACCTACCA 3'), pNlnwtR3 (5'ATTTGCCAGGTTAAGAGATCG 3') para o alelo WT, gerando fragmentos de 629 pb e pNlnkoR2 (5'CGTGTCTCTACAACACACTCC 3') para o alelo $Nln^{-/-}$ gerando um fragmento de 312 pb.

Para um volume final com 30 μ L de reação foram utilizados 2 μ L dos extratos de DNA (1:10), 3 μ L PCR Buffer 10x (100 nM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$; 0,01%), 1 μ L $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ L de dNTP 5 mM, 0,5 μ L de cada primer (10 μ M) e 0,2 μ L de TaqDNA polimerase 5 U/ μ L. As reações ocorreram no termociclador nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e a reação foi finalizada após incubação a 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram submetidos a

eletroforese em gel de agarose 2%, contendo o corante Sybr Safe (Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil), visualizadas e fotografadas no fotodocumentador ChemiDoc™MP (BioRad, USA).

3.7 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Foram realizados experimentos de PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizando o RNA total extraído do tecido adiposo retroperitoneal, para determinar os níveis de expressão de mRNAs dos genes PPAR-alfa e PPAR-gama, *ver*, LPL, FABP4, CD206c e CD11c, F4/80, PGC-1 alfa, CD36 e receptor adrenérgico beta 3 (β 3AR), relacionados à regulação do metabolismo energético e adipogênese (Tabela 1). Também foi avaliado a expressão das peptidases neprilisina (NEP), prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase 4 (DPP4), enzima degradadora de insulina (IDE) e enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1), bem como da subunidade beta 5 do proteassomo (Prot- β 5) (Tabela 1). Os tecidos foram removidos rapidamente, congelados em nitrogênio líquido, e estocados em freezer -80°C até o uso. Todas as amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído utilizando-se Trizol (Trizol® Products Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil). A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 μ g de RNA total, utilizando-se o kit cDNA High Capacity (Thermofischer, Waltham, MA USA). Curvas de diluição de amostras foram realizadas para a padronização dos ensaios, a fim de determinar a eficiência da amplificação dos RNAs mensageiros (mRNAs) dos genes alvos. O ensaio de PCR quantitativo foi realizado usando *Sybr Green MasterMix* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) com 100 nM de *primer* e 20 ng de cDNA e as corridas realizadas no equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystem, Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA). A expressão de mRNAs de interesse foi normalizada pela expressão do mRNA de

referência (Rpl19) e expressas como valores relativos utilizando o método “2^{ddCt}” (38).

Os níveis de expressão de genes alvos dos animais WT foram comparados aos Nln^{-/-}, alimentados com DP ou DH.

Tabela-1 - Sequências dos primers utilizados nos experimentos de RT-qPCR.

Gene	Sequência	Amplicon (bp)	Número de acesso
Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gama)	Fwd: ATCTTAACTGCCGGATCC Rev: CAAACCTGATGGCATTGTGAG	102	NM_001127330.2
Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR-alfa)	Fwd: TGCAATTCGCTTTGGAA Rev: CTTGCCAGAGATTTGAGGT	118	NM_011144.6
Fat acid synthase (FAS)	Fwd: GATTCGGTGTCTGCTGTC Rev: CATGCTTTAGCACCTGCTGT	95	NM_007988.3
Lipoprotein lipase (LPL)	Fwd: GTCTGGCCACTGGACAAA Rev: CCCACTTTCAAACACCCAAA	122	NM_008509.2
CD36 molecule (CD36)	Fwd: GATTGGTTGAGACCCCG Rev: GCTCCACACATTTCAGAAGGC	174	NM_001159558.1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC 1 alfa)	Fwd: AAGGGCCAAACAGAGAG Rev: AGTAAATCACACGGCGCTCTT	63	NM_008904.3
Mannose receptor (CD206)	Fwd: TGTGTTTCAGCTATTGGACGC Rev: CGGAATTTCTGGGATTGAGCTTC	133	NM_008625.2
Integrin alpha X (CD11C)	Fwd: CTGGATAGCCTTTCTTCTGCTG Rev: GCACACTGTGTCCGAACCTCA	113	NM_021334.3
Adhesion G protein-coupled receptor E1 (F4/80)	Fwd: AACATGCAACCTGCCACAAC Rev: TTCACAGGATTTCGTCCAGGC	110	NM_010130.4
Fatty acid-binding protein 4 (F4)	Fwd: CGCAGACGACAGGAAGGT Rev: TTCCATCCCCTTCTGCAC	77	NM_024406.3
Ribosomal protein L19PL19)	Fwd: CAATGCCAACTCCCGTCA Rev: GTGTTTTTCCGGCAACGAG	102	NM_009078.2
Adrenergic receptor, beta 33AR)	Fwd: ACCCTGATGATCGACATGTTCC Rev: GCCATAGTGAGGAGACAGGG	129	NM_013462.3
Nepilysin (NEP)	Fwd: CCTGAACTTTGCCAGGTGT Rev: GCGGCAATGAAAGGCATCTG	148	NM_001289462.1
Angiotensin I converting enzyme (ACE1)	Fwd: ACCCTAGGACCTGCCAATCT Rev: CGTGAGGAAGCCAGGATGTT	164	NM_207624.5
Prolyl oligopeptidase (POP)	Fwd: GGGTGCTCCGACACTAAACA Rev: GACGGGTAAGGATGTCGTC	98	NM_011156.3
Insulin degrading enzyme (IDE)	Fwd: GTCCATGTTCTTGCCAGGGA	161	NM_031156.3

	Rev: TTCACGAGGGGAAACAGTGG		
Dipeptidilpeptidase 4 (DPP4)	Fwd: GACGGCAGAGGAAGTGGTT Rev: CGCTTGCTATCCACAAATCCC	134	NM_010074.3
Proteasome subunit beta 5 (Prot-β5)	Fwd: CCAAAGTCTCGCTAACATGG Rev: GTTCCCCTCGCTGTCTACG	119	NM_011186.1

3.8 Análises histológicas

Amostras de fígado foram retiradas e imersas por 24 horas em uma solução fixadora de paraformaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M. Em seguida, foi realizada a lavagem com tampão PBS 0,1 M e, por fim, os tecidos foram imersos em álcool 70% até o processamento histológico. Os tecidos foram desidratados através de banhos em uma série crescente de etanol (70%, 95% e 100%) e, então, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica. Na parafina foram feitos cortes de 5-8 µm de espessura de modo a obter diversas regiões do tecido. Os cortes foram distendidos em banho-maria (40 °C), e dispostos em lâminas de vidro cobertas com albumina de Meyer para fixação. Após montagem das lâminas, os cortes foram colocados na estufa a 55 °C por aproximadamente 4 horas, para melhor fixação e eliminação da parafina excedente. Em seguida, foi feita desparafinação das lâminas utilizando xilol e hidratação em série decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e, posteriormente, água, para possibilitar a penetração do corante no tecido. Então, os cortes foram corados com a coloração rotineira de hematoxilina-eosina (H&E), específica para substâncias ácidas e básicas, e corados com ácido periódico Schiff (PAS). Após a coloração, foi feita novamente a desidratação, banho em xilol e, por fim, cobertura com lamínula de vidro para observação em microscópio de luz.

3.9 Peptidoma

Realizamos a análise peptidômica do tecido adiposo gonadal dos camundongos $Nln^{-/-}$ e WT, alimentados com DP ou DH. Os tecidos foram retirados e imediatamente armazenados em freezer -80°C até serem processados. Para esses ensaios, os tecidos foram pulverizados com nitrogênio líquido e em seguida colocados em tubos contendo 3 mL de água ultrapura a 80°C durante 20 min, essa etapa garante a desnaturação das proteínas e, portanto, a inativação de todas as enzimas, e evita a degradação dos peptídeos das amostras durante o processamento posterior. Com a degradação enzimática inativada, as amostras foram resfriadas por 30 min em gelo e, em seguida, acidificadas com HCl para uma concentração final de 10 mM. As amostras foram centrifugadas a $3.000 \times g$, e o sobrenadante submetido a filtração de exclusão molecular em membranas de 10 KDa (Amicon, Merck Millipore), previamente lavadas em água ultrapura, que eliminam proteínas com massa molecular relativa acima de 10 KDa. O material filtrado, contendo peptídeos, foi purificado em colunas de cromatografia C18, OASIS (Waters, Inc.). Para tal, as colunas OASIS foram previamente lavadas com 1 mL de acetonitrila, em seguida com 1 mL de acetonitrila 5% contendo 0,1% de ácido fórmico, sendo todas as soluções deixadas fluir pela gravidade. Após isso, as amostras foram aplicadas nessas colunas que, em seguida, foram lavadas com 1 mL de acetonitrila 5% contendo 0,1% de ácido fórmico, e a eluição dos peptídeos foi realizada com 1,8 mL de acetonitrila 100%, contendo 0,15% de ácido fórmico. As amostras foram semi-secas em *speed-vac* (Eppendorf) por aproximadamente 2hs, 30°C .

Os precipitados resultantes da secagem por evaporação foram ressuspensos com 60 μL de água ultrapura, e os peptídeos quantificados por absorbância a 214nm. As reações de marcação isotópica das amostras, baseada na dimetilação de grupamentos amina, foram realizadas para conferir aos peptídeos de cada grupo

experimental um ganho de massa de 28, 30, 32 ou 36Da, conforme previamente planejado.

Para o ensaio de marcação isotópica, 10 µg de peptídeos foram reconstituídos com 100mM de tampão bicarbonato de trietilamônio (TEAB, Sigma) e o pH ajustado entre 5-6, utilizando fitas de pH. Foi adicionado formaldeído regular, formaldeído deuterado ou formaldeído com ¹³C, para uma concentração final de 0,04%(15). Em seguida, foi adicionado cianoborohidreto de sódio regular ou deuterado₁ para uma concentração final de 24 mM. As amostras foram incubadas por 18 horas a temperatura 22°C, e as reações interrompidas com a adição de bicarbonato de amônio, na concentração final de 0,16%. Após 5 min em gelo as amostras foram acidificadas com ácido fórmico 0,4% e, em seguida, as amostras com diferentes marcadores agrupadas em um único tubo (contendo uma amostra de cada grupo experimental). Essas amostras de peptídeos foram então purificadas em colunas OASIS, e os peptídeos obtidos foram analisados por espectrometria de massas, do tipo electron spray, em equipamento acoplado a nano-cromatografia líquida de fase reversa (nLC-MS/MS)(15)(17).

3.10 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados quanto à significância estatística utilizando o software GraphPad Prisma 6 (GraphPad Inc.; San Diego, CA, EUA), e apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). O teste T não paramétrico foi utilizado para amostras independentes e o teste ANOVA de duas vias para análises estatísticas de 2 ou mais grupos e, nesses casos, foi usado o teste post-hoc Holm-Sidak. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes para todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1 Genotipagem de camundongos $Nln^{-/-}$

A genotipagem dos animais foi realizada por PCR (Figura 1). É possível identificar a banda de 629pb presente em animais WT (A) e ausente nos animais $Nln^{-/-}$, bem como a banda de 312pb presente em animais $Nln^{-/-}$ (B) e ausente nos animais WT (Figura 1).

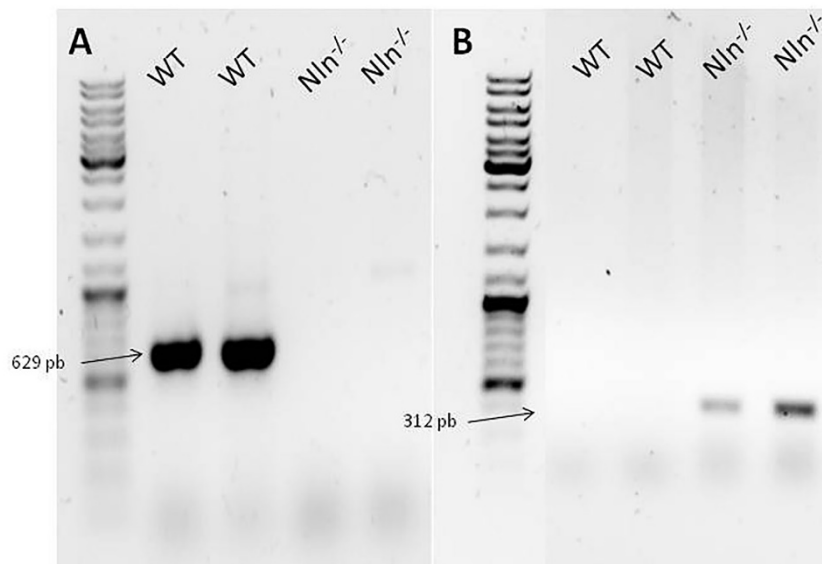


Figura 1. Genotipagem dos animais realizada por PCR. (A) é possível observar uma banda de 629pb presente em animais WT, e ausente nos animais $Nln^{-/-}$. (B) é possível observar uma banda de 312pb presente em animais $Nln^{-/-}$, e ausente nos animais WT. Gel de agarose 2%, visualizadas e fotografadas no fotodocumentador ChemiDoc™MP (BioRad, USA), após coloração do gel com o corante Sybr Safe.

4.2. Ganho de massa, consumo e tecidos corporais

Na oitava semana de vida, os animais selvagens (WT) ou neurolisina nocautes ($Nln^{-/-}$) foram pesados (massas corpóreas iniciais), antes de serem subdivididos e alimentados com DP ou DH. Na sequência, seus pesos foram verificados

semanalmente pelas próximas 8 semanas (Figura 2).

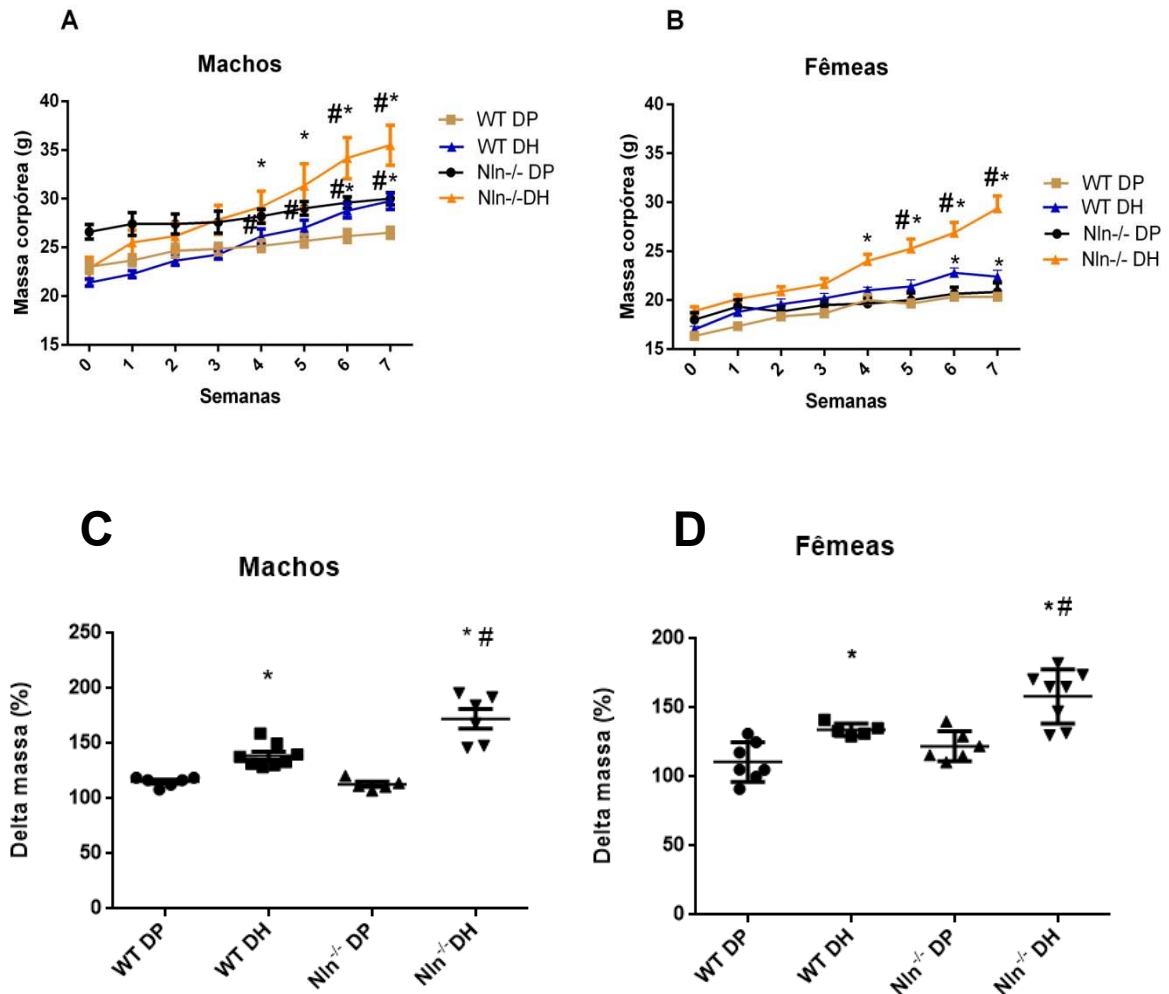


Figura 2. Ganho de massa corporal de camundongos machos ou fêmeas, selvagens (WT) ou nocaute para a Nln (Nln^{-/-}), alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hipercalórica (DH). As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. As figuras C e D mostram a variação da massa corporal dos animais (Delta de massa) no momento imediatamente anterior ao início das dietas (100% da massa corporal inicial) e aqueles obtidos após a oitava semana (massa final) recebendo DP ou DH. *, p < 0,05 entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, p < 0,05 entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média ± SEM. n= 5-8 animais por grupo.

Os animais alimentados com DP apresentaram massas corporais similares

após as oito semanas do acompanhamento, sem diferenças estatísticas entre animais WT ou $Nln^{-/-}$, machos ou fêmeas (Figura 2). Após oito semanas, os animais que receberam DH, como esperado, tiveram maior ganho de massa corporal comparados aos animais alimentados com DP, isso independente do genótipo ou sexo (Figura 2). Os animais $Nln^{-/-}$, machos ou fêmeas, alimentados com DH apresentaram, no entanto, diferenças significativas em relação ao ganho de massa corporal comparados àqueles alimentados com DP (Figura 2). As diferenças estatisticamente significantes desse maior ganho de massa corpórea dos animais $Nln^{-/-}$, machos ou fêmeas, passam a ser observadas a partir da quarta semana de DH (Figura 2, A e B).

Após oito semanas de dieta, o ganho total de massa corpórea de animais WT, machos, alimentados com DP foi de $14,6 \text{ g} \pm 1,6 \text{ g}$, enquanto o ganho de massa de animais $Nln^{-/-}$, machos, alimentados com DP foi de $16,1 \text{ g} \pm 3,3 \text{ g}$. Nesse mesmo período de oito semanas, os animais WT, machos, alimentados com DH ganharam $41,4 \text{ g} \pm 3,6 \text{ g}$ de massa corporal, enquanto os animais $Nln^{-/-}$, machos, alimentados com a mesma DH ganharam $62,6 \text{ g} \pm 6,1 \text{ g}$ de massa corporal. As fêmeas WT alimentadas com DP obtiveram um ganho de peso de $10,8 \text{ g} \pm 5,4 \text{ g}$ em relação a seu peso inicial. As fêmeas WT alimentadas com DH obtiveram um ganho de peso de $34,1 \text{ g} \pm 2,0 \text{ g}$ com relação a seu peso inicial. As fêmeas $Nln^{-/-}$ alimentadas com DP obtiveram um ganho de massa corporal de $22,2 \text{ g} \pm 4,5 \text{ g}$, enquanto as fêmeas $Nln^{-/-}$ alimentadas com DH obtiveram um ganho de massa corporal de $58,2 \text{ g} \pm 6,9 \text{ g}$. Esses dados sugerem que o ganho de massa corpórea dos animais $Nln^{-/-}$ alimentados com DH, independente do sexo, é significativamente maior comparado aos respectivos controles WT (Figura 2).

Alimentados com DH os animais $Nln^{-/-}$, machos ou fêmeas, tiveram um consumo de ração e calorias maior que os animais WT alimentados com a mesma DH

(Tabelas 2 e 3). Entre os grupos, não houve variação no consumo de água, exceto para os animais fêmeas $Nln^{-/-}$ alimentados com DH (Tabelas 2 e 3). Estes dados sugerem que os animais $Nln^{-/-}$ alimentados com DH podem ter maior ganho de massa corpórea, relativa aos respectivos controles WT, em decorrência de um maior consumo de ração.

Tabela 2. Consumo de comida e água dos animais machos investigados nesse trabalho.

Parâmetros	Machos			
	WT DP	WT DH	$Nln^{-/-}$ DP	$Nln^{-/-}$ DH
Consumo de ração (g/dia/animal)	5,02 ± 0,27	1,87 ± 0,08*	5,9 ± 0,46	2,57 ± 0,10*#
Consumo de água (mL/dia/animal)	1,3 ± 0,15	1,5 ± 0,05	1,5 ± 0,09	1,3 ± 0,16
Consumo de calorías (Kcal/dia/animal)	19,08 ± 1,02	11,54 ± 0,40*	22,43 ± 1,75	15,26 ± 0,56*#

Nota de rodapé: *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, $p < 0,05$ entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média ± SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

Tabela 3. Consumo de comida e água dos animais fêmeas investigados nesse trabalho.

Parâmetros	Fêmeas			
	WT DP	WT DH	$Nln^{-/-}$ DP	$Nln^{-/-}$ DH
Consumo de ração (g/dia/animal)	3,91 ± 0,59	1,39 ± 0,07*	4,38 ± 0,20	2,09 ± 0,16*#
Consumo de água (mL/dia/animal)	1,6 ± 0,1	2,0 ± 0,2*	1,7 ± 0,2	1,0 ± 0,1#
Consumo de calorías (Kcal/dia/animal)	14,3 ± 0,76	9,0 ± 0,36*	16,6 ± 0,78	12,5 ± 0,67*#

Nota de rodapé: *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, $p < 0,05$ entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média ± SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

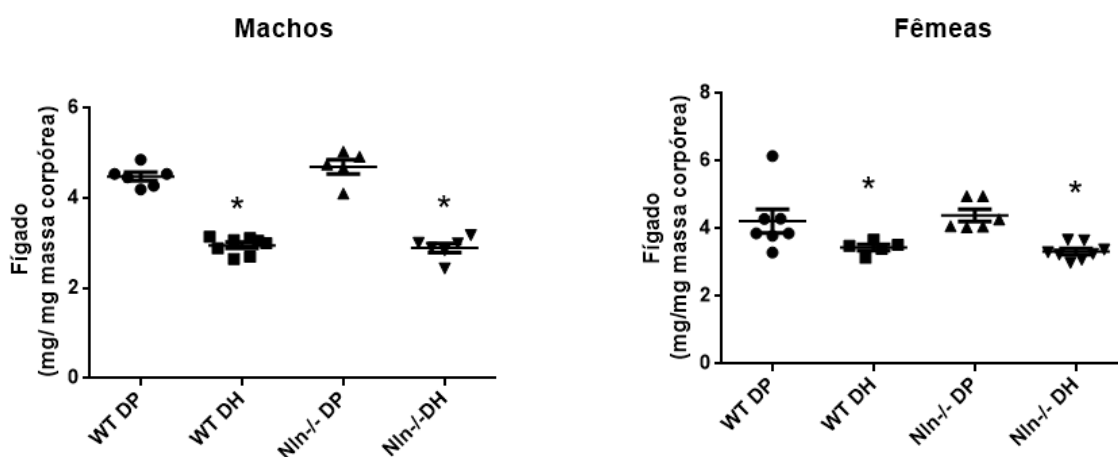


Figura 3. Peso úmido dos fígados de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou *knockout* para a Nln (Nln^{-/-}) corrigido pelo peso corporal dos animais (mg/g). *, p < 0,05 entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média ± SEM. n= 5-8 animais por grupo.

Após o período de oito semana de dieta, os animais foram anestesiados, eutanasiados, e os tecidos dissecados e pesados. O peso dos fígados dos animais alimentados com a DP, independente do genótipo ou sexo, não foram significativamente diferentes (Figura 3). Inversamente, nos animais alimentados com DH, independente do genótipo ou sexo, observou-se diminuição das massas dos fígados (Figura 3). Uma análise histológica desse tecido, utilizando a impregnação por hematoxilina-eosina (HE), sugere que os animais Nln^{-/-}, machos ou fêmeas, alimentados com DH, apresentaram maior acúmulo de lipídios no fígado (Figura 4, A e B). Esses dados sugerem que os animais Nln^{-/-} submetidos à dieta hipercalórica demonstram uma predisposição à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). No entanto, análises quantitativas adicionais são necessárias para corroborar essa sugestão.

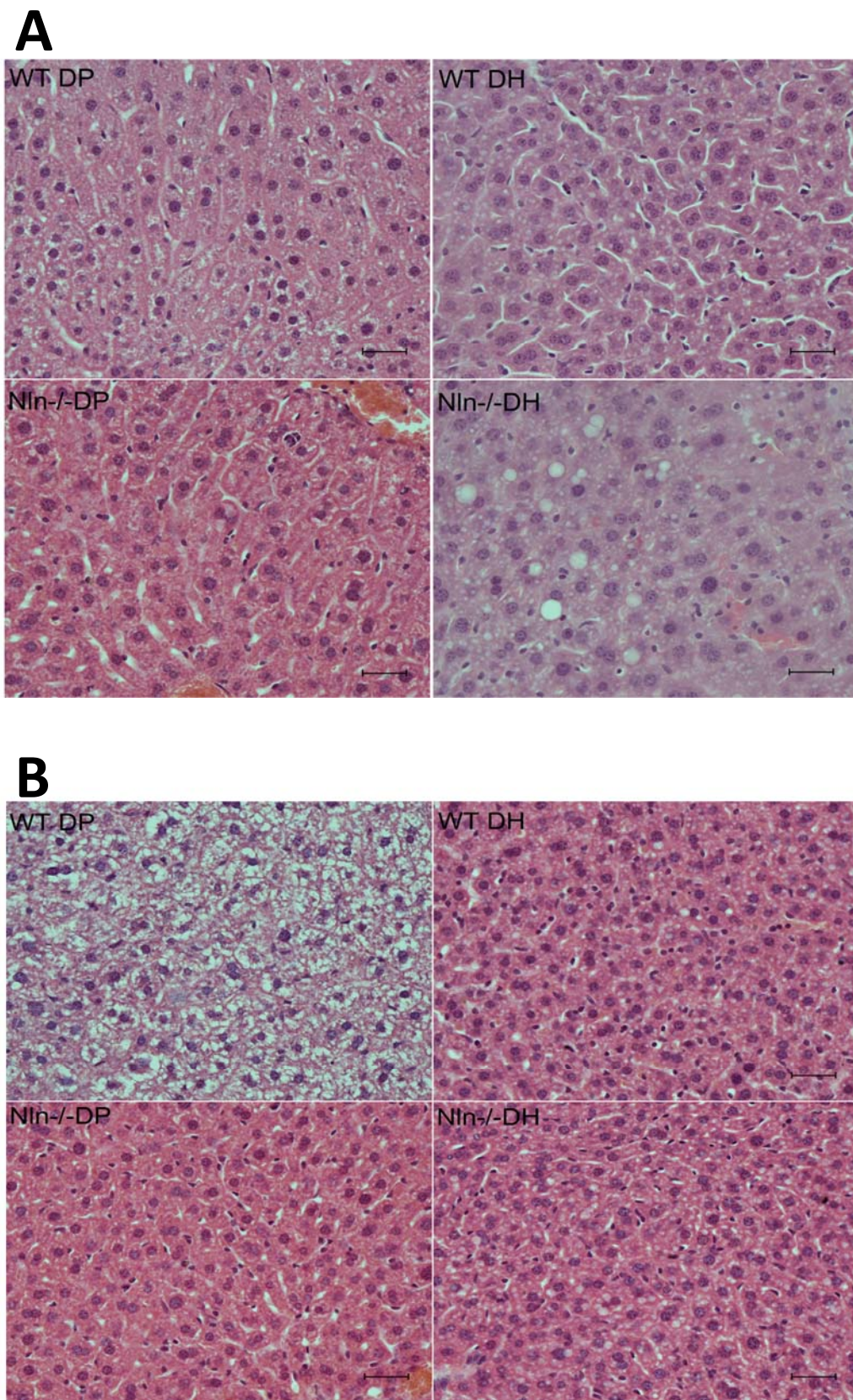


Figura 4. Cortes histológicos de fígado corados com hematoxilina e eosina (HE) dos animais machos (A) ou fêmeas (B), para verificar a presença de gotículas de gordura no tecido, um

indicativo de esteatose hepática. As imagens foram submetidas a aumento de 400 vezes. Barras, 20µm.

As massas dos tecidos adiposos inguinal (Figura 5), gonadal (Figura 6) e retroperitoneal (Figura 7) de animais em DP não evidenciaram diferenças significativas em relação aos genótipos WT ou *Nln^{-/-}*. No entanto, as massas desses tecidos foram sempre maiores em animais alimentados com DH comparados àqueles animais alimentados com DP, independente do genótipo ou do sexo (Figuras 5-7). Esses dados sugerem, como esperado, que os animais WT ou *Nln^{-/-}*, machos ou fêmeas, alimentados com DH tiveram maior ganho de peso, comparados aos respectivos controles alimentados com DP. Avaliando o efeito do genótipo sobre o ganho de massa de tecidos adiposos específicos, é possível sugerir que as fêmeas *Nln^{-/-}* tiveram um maior ganho de massa em todos os tecidos adiposos avaliados aqui (adiposo inguinal, gonadal e retroperitoneal), quando comparadas às fêmeas WT (Figuras 5-7). No caso dos animais machos *Nln^{-/-}*, alimentados com DH, apenas nos tecidos adiposos gonadal e retroperitoneal foi observado maior ganho de massa úmida, quando comparados aos machos WT (Figuras 5-7).

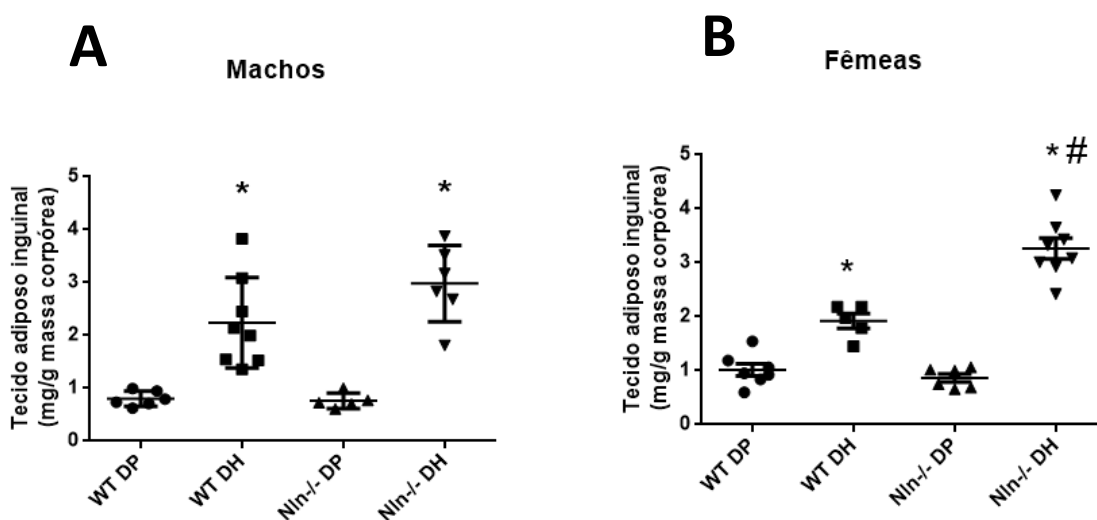


Figura 5. Massa úmida do tecido adiposo inguinal de animais machos (A) ou fêmeas (B), WT ou $Nln^{-/-}$, corrigida pela massa corporal dos animais (mg/g). *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, $p < 0,05$ entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média \pm SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

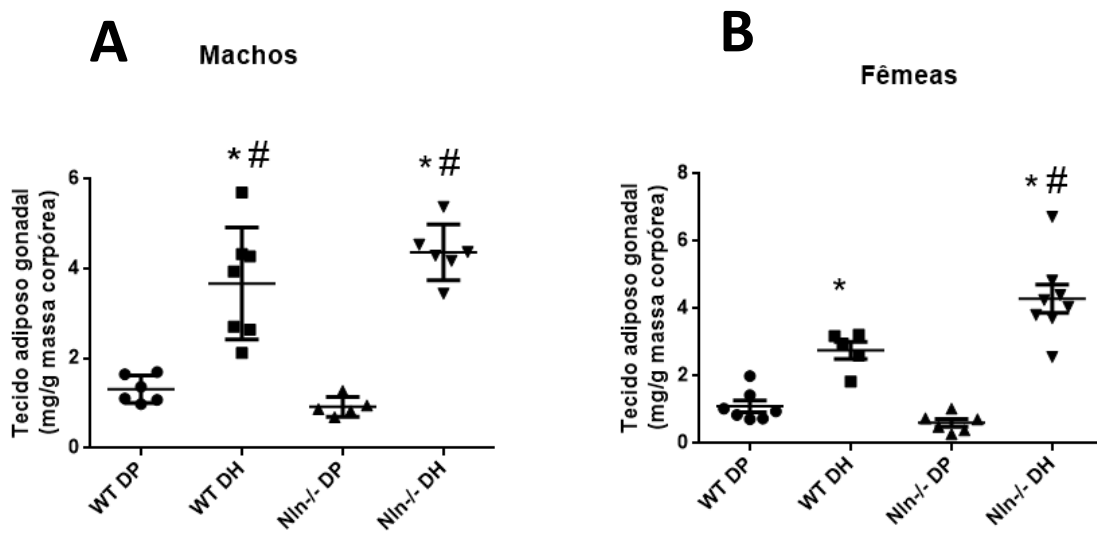


Figura 6. Massa úmida do tecido adiposo gonadal de machos (A) e fêmeas (B), WT ou $Nln^{-/-}$, corrigida pela massa corporal dos animais (mg/g). *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, $p < 0,05$ entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média \pm SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

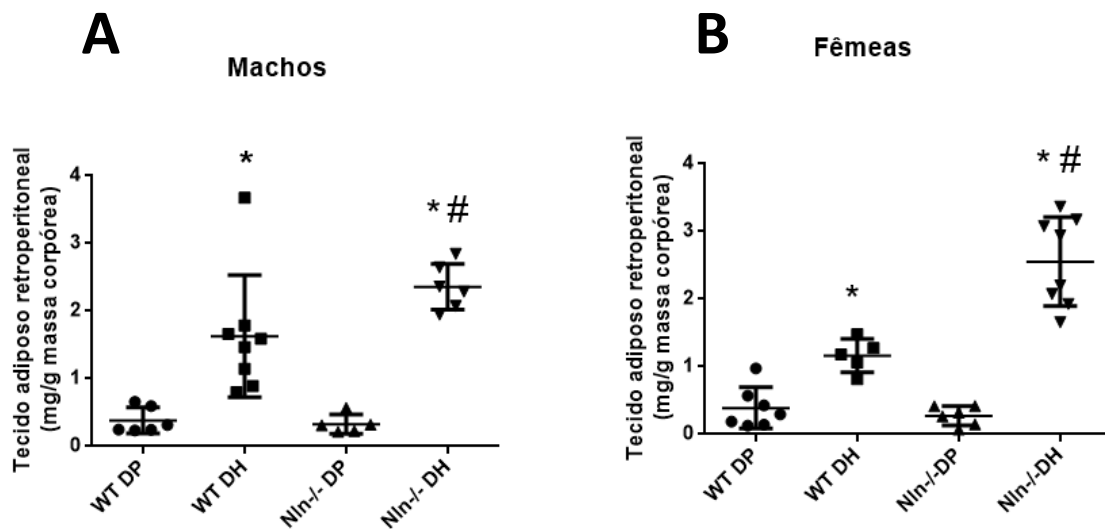


Figura 7. Massa úmida do tecido adiposo retroperitoneal de machos (A) e fêmeas (B) selvagens (WT) ou knockout para a Nln (Nln^{-/-}), corrigida pelo peso corporal dos animais (mg/g). *, p < 0,05 entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, p < 0,05 entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média ± SEM. n= 5-8 animais por grupo.

Para averiguarmos o impacto da dieta sobre a massa magra dos animais, avaliamos o peso do músculo gastrocnêmio. Os animais machos, Nln^{-/-} ou WT, alimentados com DH, tiveram menor peso deste músculo (Figura 8, A). No caso das fêmeas, apenas nos animais Nln^{-/-} alimentados com DH foi observado menor ganho de massa úmida do músculo gastrocnêmico, comparando-se aos respectivos controles WT alimentados com DH (Figura 8, B).

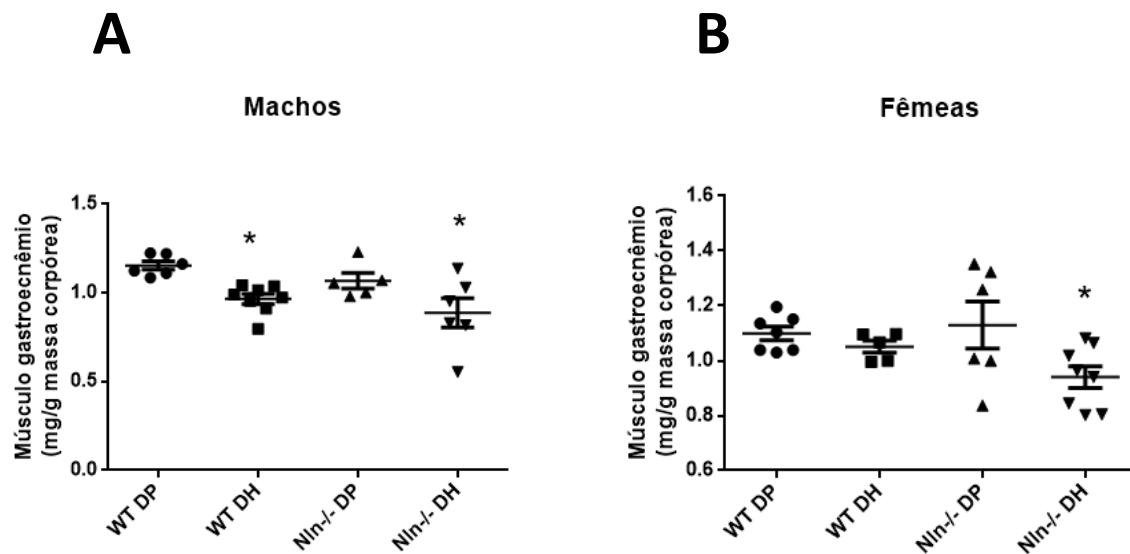


Figura 8. Massa úmida do músculo gastrocnêmio de machos (A) e fêmeas (B) WT ou Nln^{-/-}, corrigida pela massa corporal dos animais (mg/g). *, p < 0,05 entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, p < 0,05 entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média ± SEM. n = 5-8 animais por grupo.

Os animais WT e Nln^{-/-}, fêmeas e machos, que foram alimentados com DP ou DH por oito semanas, foram submetidos ao TTG, com a glicemia sendo monitorada durante 120 min, a cada intervalo de 15 min (Figura 9, A e B). Para realizarmos uma análise melhor desses dados, avaliamos a área sob as curvas (AUC) de cada grupo representado (Figura 9, C e D). A DH provocou, nos machos WT e Nln^{-/-}, uma menor captação de glicose (Figura 9, C), o que não se observa nas fêmeas, WT ou Nln^{-/-} (Figura 9, D). Não houve diferença estatisticamente significante entre a captação de glicose nos machos WT e Nln^{-/-}, quando ambos foram alimentados com DH (Figura 9, C)

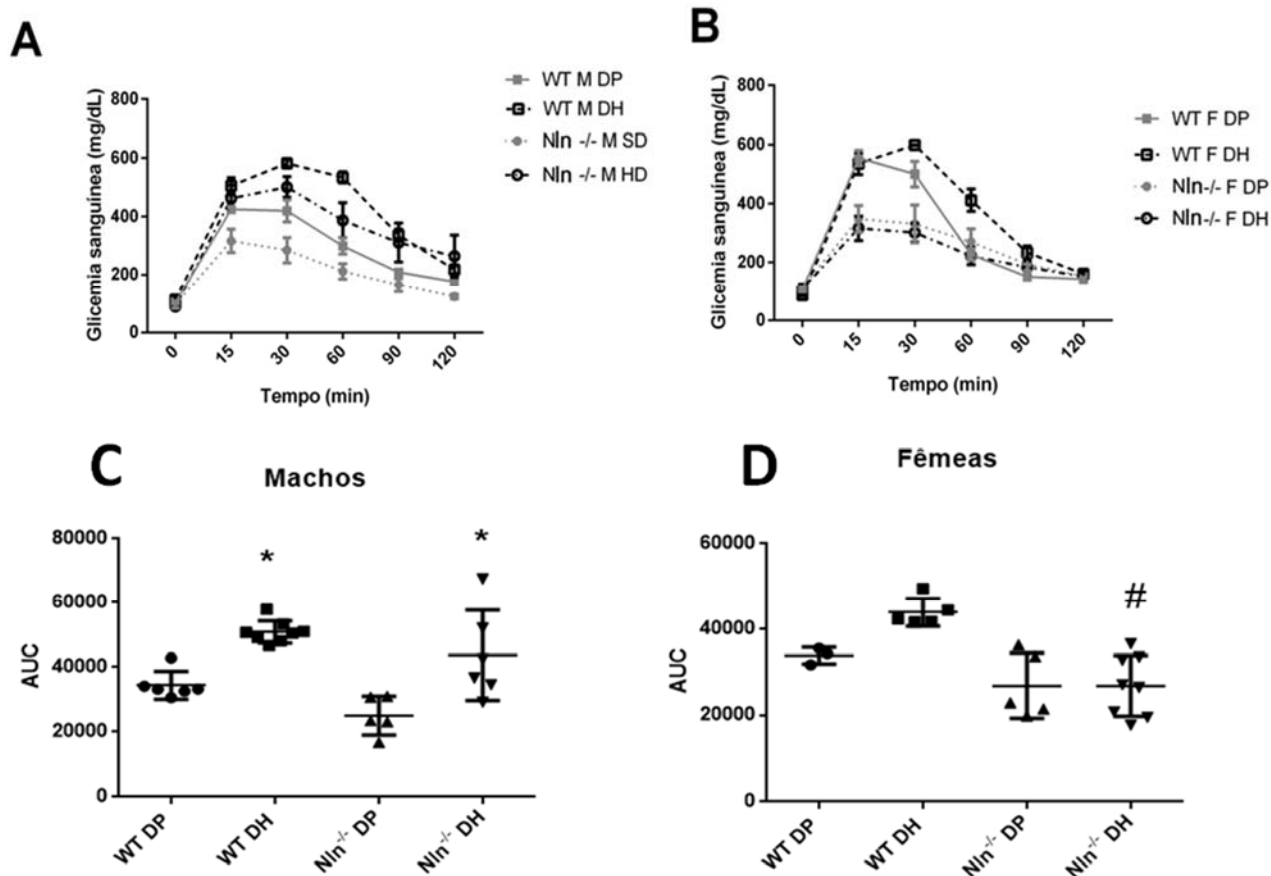


Figura 9. Teste de tolerância à glicose (TTG) em camundongos machos (A, C) e fêmeas (B, D). A e B, curvas glicêmicas no intervalo de 120 min, C e D, área sob as curvas glicêmicas dos grupos WT ou Nin^{-/-} alimentados com DP ou DH. A administração intraperitoneal de glicose (2 g/Kg) foi seguida de aferição da glicemia sanguínea com glicofita AccuCheck (Roche), nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min. Uma amostra colhida e avaliada antes da administração de glicose foi considerada como glicemia de jejum (tempo 0). *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, $p < 0,05$ entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média \pm SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

Os animais WT e $Nln^{-/-}$, machos, que foram alimentados com DP ou DH por oito semanas, foram submetidos ao ITT, com a glicemia sendo monitorada durante 16 min, a intervalos de 4 min (Figura 10, A e B). Para realizarmos uma análise melhor desses dados, avaliamos a constante de decaimento temporal da glicemia sanguínea (kITT) de cada grupo representado (Figura 10 C e D). Não houve diferença estatisticamente significativa na sensibilidade à insulina dos machos e fêmeas WT ou $Nln^{-/-}$ alimentados com DP (Figura 9, C e D). No entanto, corroborando dados anteriores, sugerindo que os animais $Nln^{-/-}$ possuem maior sensibilidade à insulina (37), houve uma tendência, embora não tenha sido estatisticamente significativa, de maior sensibilidade à insulina dos animais machos $Nln^{-/-}$ alimentados com DP (Figura 10, C). Apenas os animais $Nln^{-/-}$ machos quando alimentados com DH apresentaram uma redução significativa na sensibilidade à insulina (Figura 9, C).

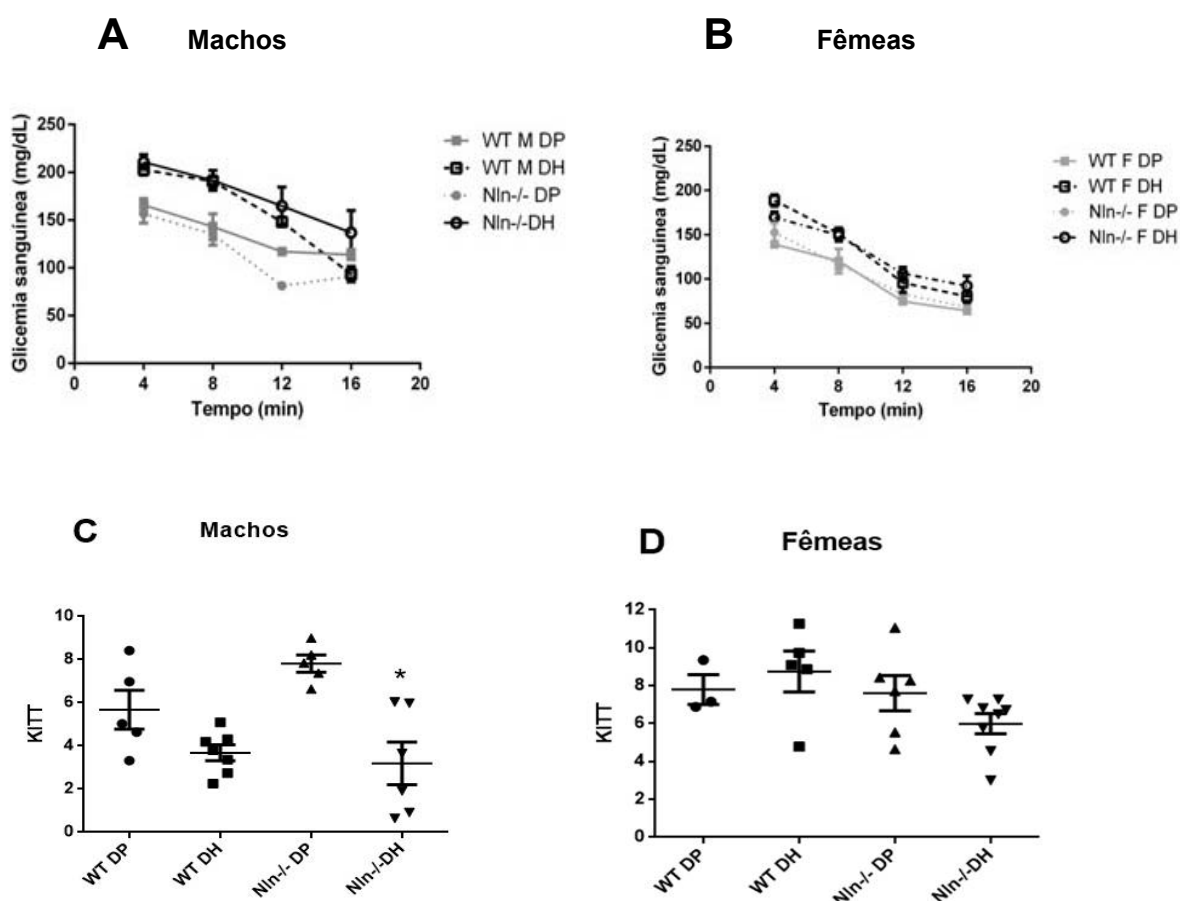


Figura 10. Teste de tolerância à insulina (TTI) em camundongos machos, WT ou $Nln^{-/-}$, alimentados com DP ou DH. A administração intraperitoneal de insulina foi seguida de aferição da glicemia sanguínea com glicofita AccuCheck (Roche), nos tempos 4, 8, 12, e 16 min (A e B). Note que apenas os animais $Nln^{-/-}$ machos alimentados com DH apresentaram reduzida sensibilidade à insulina (C). *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico; #, $p < 0,05$ entre genótipos para cada dieta específica. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média \pm SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

4.2.1 Medição de insulina sanguínea

A medida de insulina sanguínea sugeriu que apenas o grupo de fêmeas $Nln^{-/-}$, alimentadas com DH, apresenta aumento na concentração de insulina plasmática (Figura 11).

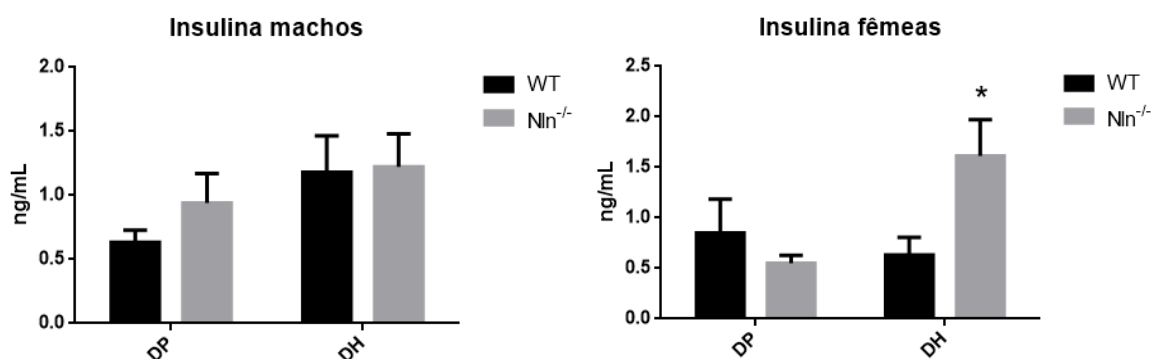


Figura 11. Avaliação quantitativa da insulina plasmática por ELISA. *, $p < 0,05$ entre dietas (DP ou DH) para cada genótipo específico. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc Holm-Sidak. Os dados são apresentados como média \pm SEM. $n = 5-8$ animais por grupo.

4.3 Análise da expressão gênica

As análises de expressão gênica de tecidos adiposos de animais machos (Tabela 4) e fêmeas (Tabela 5), WT e $Nln^{-/-}$, alimentados com DP ou DH, foram realizadas comparando-se os níveis de expressão de RNAs mensageiros (mRNAs) específicos, com a expressão do mRNA para RPL19, que é expresso de forma

constitutiva e não regulada por fatores metabólicos. Foram investigadas as expressões relativas dos seguintes genes: PPAR-alfa, PPAR-gama, FAS, LPL, FABP4, CD206c, CD11c, PGC1 alfa, F4/80 e CD36, receptor adrenérgico beta3 (β 3AR), neprilisina (NEP), prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase 4 (DPP4), enzima degradadora de insulina (IDE), enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1), e subunidade beta 5 do proteassomo (Prot- β 5). Vários destes genes sofreram alteração na sua expressão, causada pela DH, independentemente do genótipo (Tabelas 4 e 5).

Animais $Nln^{-/-}$ machos em DP apresentaram expressões dos genes PPAR gama e β 3AR diminuídas quando comparadas ao respectivo grupo WT, e estes parâmetros não sofreram alterações significativas com a DH. Já as expressões de PPAR alfa, IDE, LPL, ECA1 e Prot- β 5 estavam aumentadas em machos $Nln^{-/-}$ alimentados com DP, e esses níveis de expressão sofreram aumento induzido pela DH em ambos os genótipos (Tabela 4). Este padrão não foi observado em fêmeas, as quais não apresentaram alterações significativas na expressão dos genes citados acima. A exceção foi para o gene PPAR alfa, cuja expressão se encontrava reduzida em animais alimentados com DP, e sofreu aumento significativo tanto nos animais WT como $Nln^{-/-}$, fazendo com que os níveis do grupo $Nln^{-/-}$ se equiparasse ao de seu respectivo controle (Tabela 5).

As expressões dos genes FAS, FABP4, F4-80, CD206, CD11C e CD36, não estiveram alterados no grupo $Nln^{-/-}$ em DP comparados aos WT em DP, em ambos os sexos. Entretanto, a DH induziu aumento da expressão dos genes FABP4, CD206, CD11C, CD36 e F4-80, independente do sexo ou genótipo. Por outro lado, a expressão de FAS induzida pela DH sofreu redução independente do genótipo somente em fêmeas (Tabelas 4 e 5). Observou-se uma redução na expressão do gene

PGC-1alfa em tecidos de fêmeas $Nln^{-/-}$ comparadas a WT do grupo DP (Tabela 5). Contudo, a DH elevou os níveis de expressão desse gene no grupo $Nln^{-/-}$, eliminando a diferença encontrada entre os genótipos quando foram alimentados com DP. A expressão de DPP4 não sofreu alterações significativas em machos, porém foi aumentada com DH em fêmeas de ambos os genótipos (Tabelas 4 e 5). A expressão dos genes NEP e POP não estiveram significativamente diferentes em nenhum dos grupos estudados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Níveis de expressão gênica no tecido adiposo retroperitoneal de camundongos machos WT e $Nln^{-/-}$ analisados por RT-PCR.

Machos				
Gene	WT DP	WT DH	$Nln^{-/-}$ DP	$Nln^{-/-}$ DH
PPAR alfa	1,04 ± 0,22	54,23 ± 6,66*	5,46 ± 0,85#	47,71 ± 6,54*
PPAR gama	1,0 ± 0,05	0,82 ± 0,12	0,51 ± 0,01#	0,43 ± 0,10#
FAS	1,0 ± 0,04	0,8 ± 0,15	0,98 ± 0,17	1,04 ± 0,17
LPL	1,03 ± 0,18	7,64 ± 0,92*	4,4 ± 1,29#	7,13 ± 1,54*
FABP4	1,02 ± 0,15	1,84 ± 0,27	1,48 ± 0,29	2,94 ± 0,78*
CD206	1,0 ± 0,04	3,63 ± 1,33*	1,86 ± 0,30	4,07 ± 0,42
CD11C	1,05 ± 0,26	7,28 ± 2,46	1,43 ± 0,6	14,75 ± 6,05*
PGC-1 alfa	1,0 ± 0,07	0,74 ± 0,05	0,8 ± 0,08	0,79 ± 0,20
F4-80	1,0 ± 0,07	2,87 ± 1,26*	1,0 ± 0,14	3,98 ± 0,63*
CD36	1,0 ± 0,08	2,33 ± 0,57	1,88 ± 0,41	2,07 ± 0,48
β3AR	1,02 ± 0,18	0,59 ± 0,08*	0,48 ± 0,13#	0,32 ± 0,09#
NEP	1,0 ± 0,01	1,22 ± 0,09	1,37 ± 0,27	1,73 ± 0,27
POP	1,00 ± 0,06	1,33 ± 0,30	1,03 ± 0,16	1,33 ± 0,13
DPP4	1,00 ± 0,03	1,72 ± 0,27	1,70 ± 0,28	1,98 ± 0,50
IDE	1,01 ± 0,09	6,46 ± 0,93*	4,59 ± 0,97#	8,33 ± 0,36*
ECA1	1,03 ± 0,21	2,30 ± 0,57*	2,06 ± 0,30#	2,89 ± 0,39*
Prot-β5	1,01 ± 0,13	2,72 ± 0,31*	2,02 ± 0,41#	4,03 ± 0,40*#

Nota de rodapé: Os valores representam Média ± Erro Padrão da Média. O símbolo *

representa a comparação entre o mesmo genótipo, porém com diferentes dietas: WT DP vs WT DH, e $Nln^{-/-}$ DP vs $Nln^{-/-}$ DH. O símbolo # representa a comparação entre os genótipos com a mesma dieta: WT DP vs $Nln^{-/-}$ DP e WT DH vs $Nln^{-/-}$ DH. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. $n = 3-5$ animais por grupo.

Tabela 5. Níveis de expressão gênica no tecido adiposo retroperitoneal de camundongos fêmeas WT e $Nln^{-/-}$ analisados por RT-PCR.

Fêmeas				
Gene	WT DP	WT DH	$Nln^{-/-}$ DP	$Nln^{-/-}$ DH
PPAR alfa	2,75 ± 0,17	12,31 ± 3,74*	0,65 ± 0,15	16,13 ± 1,17*
PPAR gama	0,43 ± 0,10	0,77 ± 0,15	0,63 ± 0,11	0,60 ± 0,06
FAS	0,73 ± 0,07	0,36 ± 0,02*	0,98 ± 0,08	0,72 ± 0,10#
LPL	1,07 ± 0,08	4,19 ± 0,55*	0,56 ± 0,1	4,86 ± 0,37*
FABP4	0,72 ± 0,04	1,61 ± 0,29*	0,55 ± 0,14	1,27 ± 0,12*
CD206	0,60 ± 0,02	1,98 ± 0,28*	0,71 ± 0,14	2,28 ± 0,29*
CD11C	0,84 ± 0,15	2,09 ± 0,34	0,62 ± 0,13	4,42 ± 0,68*
PGC-1 alfa	0,93 ± 0,12	0,57 ± 0,12	0,46 ± 0,11#	0,57 ± 0,07
F4-80	0,26 ± 0,03	1,25 ± 0,08*	0,45 ± 0,07	1,80 ± 0,23*
CD36	0,69 ± 0,05	2,18 ± 0,42*	0,57 ± 0,14	2,45 ± 0,55*
β3AR	0,39 ± 0,07	0,91 ± 0,19*	0,40 ± 0,08	0,36 ± 0,06#
NEP	0,79 ± 0,10	1,14 ± 0,16	0,90 ± 0,11	1,29 ± 0,11
POP	0,89 ± 0,16	0,96 ± 0,12	0,96 ± 0,10	1,34 ± 0,13
DPP4	0,82 ± 0,21	1,35 ± 0,27*	0,87 ± 0,12	1,45 ± 0,20*
IDE	4,85 ± 1,14	5,98 ± 0,65	4,23 ± 0,90	6,96 ± 0,93
ECA1	0,62 ± 0,09	1,15 ± 0,25*	0,60 ± 0,10	1,45 ± 0,17*
Prot-β5	1,16 ± 0,11	2,16 ± 0,17	1,92 ± 0,26	3,32 ± 0,44

Nota de rodapé: Os valores representam Média + Erro Padrão da Média. Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. O símbolo * representa $p < 0,05$ na comparação entre o mesmo genótipo, porém com diferentes dietas: WT DP vs WT DH ou $Nln^{-/-}$ DP vs $Nln^{-/-}$ DH; o símbolo # representa $p < 0,05$ na comparação entre os diferentes genótipos com as mesmas dietas: WT DP vs $Nln^{-/-}$ DP ou WT DH vs $Nln^{-/-}$ DH. $n = 3-5$ animais por grupo.

4.4 Análises peptidômicas

Com a possível influência exercida pela NIn nos níveis de InPeps do tecido adiposo de camundongos WT ou $NIn^{-/-}$, alimentados com DP ou DH, estes peptídeos foram identificados e semi-quantificados utilizando marcação isotópica e espectrometria de massas (LC/MS/MS). Os dados desses experimentos sugerem que o nocaute do gene da NIn afeta os níveis de InPeps no tecido adiposo gonadal de camundongos machos e fêmeas.

Os resultados do peptidoma foram distintos entre machos (Tabela 6) e fêmeas (Tabela 7), em se tratando da sequência de peptídeos identificados. Ou seja, as sequências de peptídeos identificados no tecido adiposo gonadal dos machos não foram as mesmas identificadas nas fêmeas; uma exceção foi o peptídeo análogo do Pep19 (39) DITADDEPLGRVSF (Tabelas 6 e 7). Várias proteínas precursoras dos InPeps identificados foram observadas tanto em machos como em fêmeas (Tabelas 6 e 7).

Nos animais $NIn^{-/-}$, machos ou fêmeas, alimentados com a DH houve prevalência de peptídeos cuja razão $NIn^{-/-}/WT$ foi $< 0,5$ (machos ou fêmeas; Tabelas 6 e 7). Esses dados podem sugerir que a NIn participa do metabolismo de InPeps, particularmente quando esse tecido passa por alterações metabólicas.

Tabela 6. Sequências de peptídeos presentes no tecido adiposo gonadal de machos WT ou $Nln^{-/-}$, alimentados com DP ou DH. Os valores indicam a razão entre os grupos $Nln^{-/-}$ /WT, alimentados com DP (primeira coluna) ou DH (segunda coluna). Cor vermelha indica peptídeos cuja razão $Nln^{-/-}$ /WT foi $> 2,0$; cor verde indica peptídeos cuja razão $Nln^{-/-}$ /WT foi $< 0,5$. Em branco peptídeos cuja razão $Nln^{-/-}$ /WT foi entre 0,5-2,0.

Proteína de origem	Sequência do peptídeo	$Nln^{-/-}$ /DP/WTDP	$Nln^{-/-}$ /DH/WDH
Subunidade alfa da hemoglobina	AGHLDDLPGALSA	-0,47	-0,77
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	ANAGPNTNGSQFF	2,45	0,78
Peroxiredoxina-5, mitocondrial	APIKVGDAIPSVEVF	1,92	0,31
Subunidade alfa da hemoglobina	ASHHPADFTPAVHA	0,39	0,08
Subunidade alfa da hemoglobina	AWGKIGGHGAEYGAEAL	2,37	1,67
Subunidade beta 1 e 2 da hemoglobina	DFTPAAQAAFQK	-2,01	-2,23
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	DITADDEPLGRVSF	1,96	0,51
Proteína 3 de ligação ao RNA	DYSGSQGGYDR	1,71	0,15
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	EDENFILKH	2,89	2
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	FDITADDEPLGRVSF	2,26	0,33
Subunidade beta 1 da hemoglobina	GDLSSASAIMGNAKV	1,06	-1,48
Subunidade beta 1 da hemoglobina	GDLSSASAIMGNAKVK	-0,55	-0,46
Proteína de ligação a acil-CoA	GDVNTDRPGL	1,92	0,35
6-fosfogluconato desidrogenase	GHGGSVSSSSY	2,53	0,34
Proteína de ligação a acil-CoA	KQATVGDVNTDRPGL	1,59	0,2
Glutamina sintetase	LLNETGDEPFQYKN	3,62	3,16
Partner of Y14 and mago	SLGDTAQIPSALQGPOATPL	-0,97	-1,5
Malato desidrogenase, mitocondrial	VAVLGASGGIGQPLSLLK	-2,5	-2,64

Tabela 7. Sequências de peptídeos presentes no tecido adiposo gonadal de fêmeas WT ou $Nln^{-/-}$, alimentados com DP ou DH. Os valores indicam a razão entre os grupos $Nln^{-/-}$ /WT, alimentados com DP (primeira coluna) ou DH (segunda coluna). Cor vermelha indica peptídeos cuja razão $Nln^{-/-}$ /WT foi $> 2,0$; cor verde indica peptídeos cuja razão $Nln^{-/-}$ /WT foi $< 0,5$. Em branco peptídeos cuja razão $Nln^{-/-}$ /WT foi entre 0,5-2,0.

Proteína de origem	Sequência do peptídeo	$Nln^{-/-}$ /DP/WTDP	$Nln^{-/-}$ /DH/WTDH
Subunidade alfa da hemoglobina	AAGHLDDLPGALSAL	1,19	-0,33
Proteína transportadora de esteróis	AGNMGLAMK	-4,78	-0,12
Subunidade beta 1 e 2 da hemoglobina	AQAAFQKV	-3,32	3,09
Subunidade beta 1 e 2 da hemoglobina	AQAAFQKVVAGVA	5,09	3,43
Subunidade alfa da hemoglobina	ASFPTTK	2,78	3,78
Subunidade alfa da hemoglobina	ASVSTVLTSKY	0,89	-1,76*
Transcetolase	AVWAEAGFLPEAE	1,08	0,68
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	DITADDEPLGRVSF	-0,95	-2,58
Albumina	GEYGFQNAILVR	-0,46	-2,6
Proteína rica em cisteína e glicina	GFGFGQGAGALVHSE	-1,78	-0,21
Homólogo associado ao microtúbulo de Júpiter	GSGIFDESTPVQTR	2,07	1,25
Subunidade do citocromo C oxidase	HNPVHVNPLPTGYEDE	0,24	-3,11
Subunidade alfa da hemoglobina	LASVSTVLTSK	0,91	-1,69
Subunidade alfa da hemoglobina	LASVSTVLTSKY	2,25	-1,68
Subunidade alfa da hemoglobina	LASVSTVLTSKYR	0,37	-0,62
Glutamina sintetase	LNETGDEPFQYKN	1,76	-2,76
Subunidade beta 1 da hemoglobina	NDGLNHLDSLK	0,21	3,39
Subunidade beta 1 da hemoglobina	NDGLNHLDSLKGTFA	1,28	-2,1
Albumina	NDLGEQHFQGLV	5,63	0,94
Proteína de ligação a acil-CoA	QATVGDVNTDRPGLLD	1,31	-0,2
Histona H1.0	SDMIVAAIQAEKN	4,07	0,55
Subunidade alfa da hemoglobina	SHHPADFTPA	1,35	1,11
Subunidade alfa da hemoglobina	SHHPADFTPAVHASLDK	2,65	-2,56
Apolipoproteína A-I	SNPTLNEYHTR	-0,16	7,15
Subunidade beta 1 da hemoglobina	SSASAIMGNQKV	4,9	-0,76
Proteína de ligação a ácidos graxos	TLDGGALVQVQK	-0,54	-3,59
Vimentina	VETRDGQVINETSQ	-0,75	3,5

5. DISCUSSÃO

Nessa dissertação, observamos que os animais $Nln^{-/-}$ alimentados com DH, machos ou fêmeas, têm maior ganho de massa corpórea em relação aos respectivos controles WT. A relação causal desse fenótipo pode estar relacionada ao maior consumo calórico observado dos animais $Nln^{-/-}$ quando esses são comparados aos animais WT, ambos alimentados com DH. Observamos, no entanto, que alimentados com DP todos os animais, machos e fêmeas, WT ou $Nln^{-/-}$, apresentam fenótipos similares quanto ao consumo calórico, bem como massa corpórea. Estes dados sugerem a participação fisiológica da Nln na homeostase energética, mensurável quando os animais são alimentados com DH. Experimentos adicionais são necessários para uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos relacionados a essas alterações no fenótipo dos animais $Nln^{-/-}$ alimentados com DH.

A indução da obesidade por DH evidenciou ganho de massa corpórea nos animais WT e $Nln^{-/-}$, particularmente após a quarta semana de alimentação. A aferição da massa tecidual desses animais, após terem sido submetidos às oito semanas de alimentação com DH, sugere que o aumento na massa corpórea ocorreu por ganho de massa úmida dos tecidos adiposos inguinal, gonadal e retroperitoneal. Estas alterações corroboram que a dieta hipercalórica fornece proporcionalmente maior teor de gordura e açúcares do que proteínas, influenciando o maior ganho de peso e a redução na saúde de indivíduos (40, 41). Estes dados também sugerem que pode estar havendo uma redução na metabolização de gordura (lipólise), especificamente nos tecidos adiposos dos animais $Nln^{-/-}$, independente do sexo destes animais.

A diminuição da captação de glicose plasmática, observada pelo TTG, em animais alimentados com DH por oito semanas, ocorreu apenas em machos,

independente do genótipo. O grupo de fêmeas em DH não demonstrou alteração significativa na captação de glicose sanguínea quando comparado ao seu respectivo controle alimentado com DP. De fato, as diferenças metabólicas entre machos e fêmeas têm sido relatadas, demonstrando que camundongos fêmeas expressam conteúdos mais elevados do transportador de glicose (GLUT4) nos tecidos adiposos brancos que os machos(42). Houve uma diferença significativa entre o perfil glicêmico de fêmeas WT e Nln^{-/-} em ambas as dietas. Sugerindo uma maior eficiência de captação de glicose, fato esse que também pode ser observado em machos Nln^{-/-} comparados aos WT. A regulação da glicemia ocorre por vários mecanismos, incluindo a participação do transportador GLUT4 e a secreção de insulina, cuja deficiência pode gerar o quadro de resistência insulínica evoluindo para o diabetes tipo 2. Estudos anteriores sobre a caracterização dos Nln^{-/-} mostraram uma maior sensibilidade desses animais à insulina, justificada pelo aumento de fosforilação de AKT em tecido muscular e adiposo(37). No entanto, alimentados com DH os animais machos Nln^{-/-}, mas não as fêmeas, apresentaram piora na tolerância à glicose, esta observada pela mudança de perfil da curva glicêmica no TTG e piora na sensibilidade à insulina. Os mecanismos moleculares relacionados a esta perda na sensibilidade aumentada à insulina dos animais Nln^{-/-}, quando eles foram alimentados com DH, precisam ser melhor investigados. Uma sugestão é que a maior obesidade observada nos animais Nln^{-/-} contribua para uma alteração na transdução do sinal do receptor de insulina, reduzindo a fosforilação da AKT após a liberação fisiológica de insulina.

Não houve nos animais machos uma alteração nos níveis fisiológicos plasmáticos de insulina, independente do genótipo e da alimentação com DP ou DH. Apenas as fêmeas Nln^{-/-}, quando alimentadas com DH, apresentaram níveis insulinêmicos elevados. Estes dados sugerem que o dimorfismo sexual metabólico,

apontado como responsável pela maior susceptibilidade de fêmeas desenvolver resistência à insulina(43-45), se mantém nos animais $NIn^{-/-}$.

Para avaliar o perfil metabólico do tecido adiposo avaliamos a abundância de diversos mRNAs, como ferramenta para inferir alterações nos níveis de suas respectivas proteínas funcionais. Foi observada redução da expressão de PPAR gama e β 3AR em machos $NIn^{-/-}$ alimentados com DH, quando comparados aos animais WT alimentados com DH. Portanto, a diminuição dos níveis de PPAR gama e β 3AR poderia gerar aumento do conteúdo lipídico, por diminuição da lipólise, e maior resistência à insulina. Em fêmeas $NIn^{-/-}$ alimentadas com DH, o tecido adiposo branco parece ser mais protegido, e nestes a expressão de PPAR gama e β 3AR não sofreu alteração. Em contrapartida, as fêmeas $NIn^{-/-}$ alimentadas com DH apresentaram altos níveis insulinêmicos, que podem ter contribuído para níveis normais da curva glicêmica. Assim, o ganho de massa dos tecidos adiposos observado nos animais $NIn^{-/-}$ alimentados com DH pode estar associada tanto à melhora na sensibilidade à insulina, em como na inibição da lipólise.

O aumento na expressão de PPAR alfa é normalmente encontrado em animais alimentados com DH, e está associado aos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, ligantes destes receptores, neste tipo de dieta(46). A expressão de PGC-1 alfa não sofreu alterações significativas nos tecidos adiposos de animais machos, mesmo nos animais $NIn^{-/-}$. Porém, PGC-1 alfa esteve diminuído em fêmeas $NIn^{-/-}$ comparadas às WT alimentadas com DP. Estes resultados corroboram que PGC-1 alfa está associado ao processo de gliconeogênese, devido à sua ação na oxidação de ácidos graxos(47), e sua diminuição nas fêmeas poderia ser um dos mecanismos pelos quais a capacidade de gliconeogênese foi demonstrada alterada nesses animais(37). A expressão diminuída da PGC-1 alfa em animais em DH era esperada, pois, essa

proteína se encontra diminuída no estado alimentado, e aumentada no jejum(48). A composição de altas taxas de ácidos graxos na alimentação hipercalórica poderia explicar o aumento da expressão do gene da LPL nos grupos que receberam DH, uma vez que esses metabólitos são o principal substrato da LPL. O aumento da massa dos adipócitos tem sido apontado como um fator de diminuição de suprimento sanguíneo, uma vez que o aumento do tamanho dos adipócitos não é acompanhado por uma angiogênese adequada. Portanto, levando a um quadro de hipóxia local, gerando assim uma resposta inflamatória, que provoca um aumento na liberação de citocinas e acarreta maior atração e migração de macrófagos(49). Este fato pode justificar a alta expressão dos marcadores de macrófagos F4-80, CD206, CD11-C e CD36 nos grupos de machos e fêmeas alimentados com DH, independente do genótipo.

Os estudos empregando animais com deleção da expressão gênica se expandiu a partir do início da década de 1990, e desde então tem gerado resultados importantes, mas também intrigantes. Pois, a falta de uma determinada proteína inicialmente pensada ser um desafio letal para os animais, acabou gerando resultados surpreendentes levando os cientistas a descobrir mecanismos de compensação como uma adaptação ao diferente genótipo. Pensando nisso, decidimos verificar se a expressão de outras peptidases, como NEP, POP, DPP4, IDE, ECA1 e Prot-β5, estariam se alterando para compensar a falta da NIn nos animais desse estudo, sobretudo quando eles foram desafiados com uma dieta hipercalórica. As análises de expressão gênica no tecido adiposo retroperitoneal, realizadas em animais machos alimentados com DP, indicam maiores quantidades relativas de RNAm para IDE e Prot-β5, nos animais NIn^{-/-} comparados aos animais WT. Após serem alimentados com DH, estes dois genes mantiveram expressão aumentada nos animais NIn^{-/-} comparados aos WT, embora a significância estatística tenha sido observada apenas

para o gene Prot- β 5. Esses resultados sugerem que alterações nas expressões de outras peptidases possam estar envolvidas em mecanismos de compensação pela falta da NIn, cuja função fisiológica parece ser influenciada pela dieta e pelo gênero dos animais, sendo as fêmeas mais protegidas a alterações que os machos.

A terapêutica com peptídeos teve início com a extração da insulina extraída do pâncreas de animais, que foi aplicada do tratamento da diabetes tipo I, a partir de 1922 e uma segunda onda de medicamentos peptídicos, os liberadores de gonadotrofinas sintéticas leuprolida e goserelina, ao final de 1980, antecedeu a confirmação da viabilidade do uso destes tipos de medicamentos e a duplicação dos estudos clínicos de peptídeos entre 2000 e 2010. Atualmente, além da insulina, são aproximadamente 80 medicamentos peptídicos no mercado global(50-54). Há ainda um grupo específico de InPeps cujas atividades biológicas estão envolvidas em processos metabólicos, entre esses podemos citar o Pep19(39, 55) e o Ric4(37, 56). O Pep19 foi obtido após modificações racionais de um peptídeo intracelular natural da proteína peptidil-prolil cis-trans isomerase A (DITADDEPLT) e é um novo promissor candidato peptídico para controle e prevenção de sobrepeso e obesidade(39, 55). Outro peptídeo, nomeado Ric4, que deriva da cadeia alfa da hemoglobina (LASVSTVLTSK), demonstrou especificidade e potencial terapêutico para expressar genes relacionados à gliconeogênese e à contração do músculo esquelético (56). Seu potencial também foi observado na ativação da insulina pela fosforilação de Akt e sinalização mais frequentemente associadas com Glut4, induzindo captação de glicose (56).

A definição de um determinado fenótipo ocorre devido interações macromoleculares intrincadas. Vias de sinalização complexas ocorrem dentro das células para regular estas interações e alterações nestas foram usadas para prever

novos alvos de doenças humanas(57-61). Nosso grupo sugere que peptídeos denominados InPeps, gerados no meio intracelular pela ação do coordenada do proteassoma e subsequentes peptidases, possam ser fisiologicamente funcionais, modulando a transdução de sinal de receptores acoplados à proteína G (por exemplo, receptores At1 para angiotensina I, adrenérgicos sensíveis ao isoproterenol, canabinóides sensíveis às hemopressinas)(62, 63) ou tirosina kinase(37, 63-65), alterando interações proteína-proteína (PPI)(66, 67), e interferindo na expressão gênica pela interação física com microRNAs específicos(68). Anteriormente, em um modelo animal semelhante ao que empregamos nesse trabalho, animais com supressão gênica da expressão da thimet oligopeptidase (EC3.4.24.15; THOP1^{-/-}) mostraram-se resistentes à obesidade induzida pela DH(68, 69). Níveis alterados de InPeps específicos foram identificados no tecido adiposo de camundongos THOP1^{-/-} alimentados com DH, e sugeridos serem responsáveis pelo fenótipo de resistência à obesidade(69). Esse mecanismo foi sugerido envolver a interação física entre InPeps e microRNAs específicos, que levariam a uma alteração na expressão de genes que controlam o metabolismo energético(68). No presente trabalho, a análise peptidômica sugere uma redução nos níveis de InPeps NIn^{-/-}/WT, identificados no tecido adiposo gonadal de animais machos ou fêmeas, alimentados tanto com DP ou DH. Esses dados corroboram a sugestão que no tecido gonadal dos animais NIn^{-/-}, a alteração no metabolismo de InPeps possa influenciar alterações metabólicas como maior ganho de massa corpórea, maior ganho de massa úmida no tecido adiposo, e maior esteatose hepática. Também, chama atenção o fato dos animais THOP1^{-/-} alimentados com DP ou DH terem elevados níveis de expressão dos receptores β 3AR, enquanto os animais NIn^{-/-} têm reduzida expressão destes receptores como mencionado acima. Reforçando a sugestão acima que as oligopeptidases, modulando

o sistema adrenérgico, regulam a sensibilidade à insulina e a lipólise no tecido adiposo, e corroborando sugestões anteriores de participação dos InPeps e das oligopeptidases na transdução de sinal de receptores adrenérgicos(63, 68).

Quando presente, a partir da degradação inicial de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma(13, 18, 51, 70), a Nln inativa ou gera InPeps menores a partir de peptídeos maiores(23, 71). O nocaute da Nln afeta os níveis de peptídeos que foram identificados no tecido adiposo gonadal dos camundongos WT e Nln^{-/-} que, na presença da Nln, seriam seus substratos e/ou produtos. Os peptídeos eliminados ou diminuídos, quando a enzima é deletada (como no caso desse nosso estudo, utilizando os animais Nln^{-/-}), são tidos como seus produtos, uma vez que a hidrólise dos peptídeos maiores não ocorreu no modelo nocaute. A marcação e semi-quantificação foi realizada para verificarmos o perfil global e as alterações no conteúdo peptídico do tecido adiposo gonadal dos animais Nln^{-/-} em DP e DH, comparados com os animais WT em DP e DH (razão Nln^{-/-}/WT). Foi tida como base a comparação com as razões Nln^{-/-}/WT de projetos anteriores(37, 71), estendendo este projeto para desafiar os animais Nln^{-/-} com a indução da obesidade. Os peptídeos identificados nesse trabalho não foram completamente coincidentes entre os peptídomas de machos e fêmeas, alimentados com DP ou DH, e tendo genótipo WT ou Nln^{-/-}. A sequência LASVSTVLTSKYR, anteriormente nomeada Ric4(56), foi encontrada diminuída no peptidoma de fêmeas Nln^{-/-} alimentadas com DP ou DH. Deste peptídeo, que despertou o interesse do grupo, foram extraídas possibilidades de melhora na captação de glicose e diminuição da glicemia sanguínea(52). No presente trabalho, a diminuição nos níveis deste peptídeo Ric4 em fêmeas, pode contribuir para uma reduzida captação de glicose e aumento da glicemia sanguínea de animais Nln^{-/-} alimentados com DH.

O controle da alimentação no cérebro humano e de roedores envolve vários sistemas neurais, mas principalmente o hipotálamo que é relacionado à regulação da ingestão de alimentos(72, 73). O núcleo arqueado do hipotálamo controla o apetite e contém neurônios que expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), que diminuem o apetite e aumentam o gasto de energia, e neurônios que expressam proteína relacionada ao agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY), que aumentam o apetite e diminuem o gasto energético(73). Esses neurônios são modulados por sinais hormonais periféricos, que atuam no hipotálamo para inibir ou excitar esses neurônios para alterar o apetite(72, 73). A interferência do nocaute da Nln no ganho de massa corpórea, adiposa, no perfil glicêmico, nos níveis de expressão de genes específicos e no perfil de InPeps pode sugerir um novo mecanismo de controle metabólico. Assim, a Nln controla o balanço energético por meio do controle dos níveis de InPeps nos tecidos adiposo e hepático. Além disso, o fato dos animais Nln^{-/-} terem apresentado maior ingesta calórica, ao contrário dos animais THOP1^{-/-} que apresentam menor ingesta calórica e são resistentes à obesidade(68), é possível que alterações nos níveis de InPeps no sistema nervoso central (SNC) também contribua para o controle do balanço energético. Uma análise anterior do metabolismo de InPeps no cérebro de camundongos Nln^{-/-} ou THOP1^{-/-} sugere que essas oligopeptidases são chave na degradação *in vivo* de alguns peptídeos específicos(71, 74). Assim, estudos adicionais são necessários para investigar o papel da Nln no metabolismo de InPeps, particularmente em áreas do cérebro críticas na regulação do apetite e do comportamento de ingesta alimentar(72). Estes estudos poderiam revelar, por exemplo, uma participação da Nln no metabolismo de peptídeos em circuitos neuronais que controlam a ingesta alimentar.

Nosso projeto corrobora dados anteriores associando as oligopeptidases à homeostase fisiológica em modelos animais. O potencial que as alterações no perfil peptídico intracelular, decorrente da ausência de oligopeptidases como THOP1 e Nln, têm na melhora da qualidade de vida de seres humanos com distúrbios no metabolismo de gordura, entre os quais os diabéticos, com sobrepeso ou obesos, merece atenção.

6. CONCLUSÃO

Foi possível observar que a Nln desempenha papel no metabolismo energético, pois nossos resultados sugerem maior ganho de massa corporal e maior deposição de gordura nos tecidos adiposos e hepático em animais alimentados com DH. Para projetos posteriores, será importante investigar o papel da oligopeptidase Nln no metabolismo energético através de modelos que induzam a obesidade em animais WT e Nln^{-/-}, investigando profundamente os mecanismos moleculares de controle da expressão de genes relacionados à obesidade. Conhecendo mais a fundo o papel da Nln no metabolismo energético, mediada pelos InPeps que sejam seus substratos ou produtos, avançaremos no conhecimento sobre a biologia e as funções das oligopeptidases e dos InPeps nos organismos.

7. REFERÊNCIAS

1. Müller MJ, Geisler C. Defining obesity as a disease. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(11):1256-8.
2. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology.* 2019;15(5):288-98.
3. Louzada ML, Baraldi LG, Steele EM, Martins AP, Canella DS, Moubarac JC, et al. Consumption of ultra-processed foods and obesity in Brazilian adolescents and adults. *Prev Med.* 2015;81:9-15.
4. de Mendonça M, Rocha KC, de Sousa É, Pereira BM, Oyama LM, Rodrigues AC. Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to promote their beneficial effects in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2020;319(3):E579-E91.
5. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *New England Journal of Medicine.* 2017;376(3):254-66.
6. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;205(2):194-208.
7. Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell metabolism.* 2014;20(3):396-407.
8. Stanford KI, Goodyear LJ. The therapeutic potential of brown adipose tissue. *Hepatobiliary surgery and nutrition.* 2013;2(5):286.
9. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine.* 2011;17(2):200-5.
10. Schoenheimer R. The dynamic state of body constituents. *The Dynamic State of Body Constituents.* 1942(3).

11. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1999;28:295-317.
12. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79.
13. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003;426(6968):895-9.
14. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem.* 1999;274(6):3363-71.
15. Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, et al. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity.* 2003;18(1):97-108.
16. Berti DA, Morano C, Russo LC, Castro LM, Cunha FM, Zhang X, et al. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 2009;284(21):14105-16.
17. Rock KL, York IA, Goldberg AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol.* 2004;5(7):670-7.
18. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol.* 2002;39(3-4):147-64.
19. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature.* 1992;357(6377):375-9.

20. Ferro ES, Hyslop S, Camargo AC. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. *J Neurochem.* 2004;91(4):769-77.
21. Dauch P, Vincent JP, Checler F. Molecular cloning and expression of rat brain endopeptidase 3.4.24.16. *J Biol Chem.* 1995;270(45):27266-71.
22. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy.* 2021;17(1):1-382.
23. Checler F, Ferro ES. Neurolysin: From Initial Detection to Latest Advances. *Neurochem Res.* 2018;43(11):2017-24.
24. Rioli V, Kato A, Portaro FC, Cury GK, te Kaat K, Vincent B, et al. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(1):5-11.
25. Checler F, Emson PC, Vincent JP, Kitabgi P. Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro¹⁰-Tyr¹¹ bond by endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and a peptidase different from proline-endopeptidase. *J Neurochem.* 1984;43(5):1295-301.
26. Fontenele-Neto JD, Massarelli EE, Gurgel Garrido PA, Beaudet A, Ferro ES. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. *J Comp Neurol.* 2001;438(4):399-410.
27. Massarelli EE, Casatti CA, Kato A, Camargo AC, Bauer JA, Glucksman MJ, et al. Differential subcellular distribution of neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in the rat brain. *Brain Res.* 1999;851(1-2):261-5.

28. Kato A, Sugiura N, Saruta Y, Hosoiri T, Yasue H, Hirose S. Targeting of endopeptidase 24.16 to different subcellular compartments by alternative promoter usage. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15313-22.
29. Ray K, Hines CS, Coll-Rodriguez J, Rodgers DW. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *J Biol Chem.* 2004;279(19):20480-9.
30. Lian W, Chen G, Wu D, Brown CK, Madauss K, Hersh LB, et al. Crystallization and preliminary analysis of neurolysin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2000;56(Pt 12):1644-6.
31. Brown CK, Madauss K, Lian W, Beck MR, Tolbert WD, Rodgers DW. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3127-32.
32. Barelli H, Fox-Threlkeld J, Dive V, Daniel E, Vincent J, Checler F. Role of endopeptidase 3.4. 24.16 in the catabolism of neurotensin, in vivo, in the vascularly perfused dog ileum. *British journal of pharmacology.* 1994;112(1):127.
33. Acker GR, Molineaux C, Orłowski M. Synaptosomal membrane-bound form of endopeptidase-24.15 generates Leu-enkephalin from dynorphin1-8, alpha- and beta-neoendorphin, and Met-enkephalin from Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8. *J Neurochem.* 1987;48(1):284-92.
34. Jeske NA, Berg KA, Cousins JC, Ferro ES, Clarke WP, Glucksman MJ, et al. Modulation of bradykinin signaling by EP24.15 and EP24.16 in cultured trigeminal ganglia. *J Neurochem.* 2006;97(1):13-21.
35. Stadler M, Hellwig V, Mayer-Bartschmid A, Denzer D, Wiese B, Burkhardt N. Novel analgesic triglycerides from cultures of *Agaricus macrosporus* and other

basidiomycetes as selective inhibitors of neurolysin. *J Antibiot (Tokyo)*. 2005;58(12):775-86.

36. Norman MU, Reeve SB, Dive V, Smith AI, Lew RA. Endopeptidases 3.4.24.15 and 24.16 in endothelial cells: potential role in vasoactive peptide metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(6):H1978-84.

37. Cavalcanti DMLP, Castro LM, Rosa Neto JC, Seelaender M, Neves RX, Oliveira V, et al. Neurolysin knockout mice generation and initial phenotype characterization. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(22):15426-40.

38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-8.

39. Reckziegel P, Festuccia WT, Britto LRG, Jang KLL, Romao CM, Heimann JC, et al. A novel peptide that improves metabolic parameters without adverse central nervous system effects. *Sci Rep*. 2017;7(1):14781.

40. Leaf A, Antonio J. The Effects of Overfeeding on Body Composition: The Role of Macronutrient Composition - A Narrative Review. *Int J Exerc Sci*. 2017;10(8):1275-96.

41. Kwon YJ, Lee HS, Park JY, Lee JW. Associating Intake Proportion of Carbohydrate, Fat, and Protein with All-Cause Mortality in Korean Adults. *Nutrients*. 2020;12(10).

42. Queathem ED, Welly RJ, Clart LM, Rowles CC, Timmons H, Fitzgerald M, et al. White Adipose Tissue Depots Respond to Chronic Beta-3 Adrenergic Receptor Activation in a Sexually Dimorphic and Depot Divergent Manner. *Cells*. 2021;10(12).

43. Kim S-N, Jung Y-S, Kwon H-J, Seong JK, Granneman JG, Lee Y-H. Sex differences in sympathetic innervation and browning of white adipose tissue of mice. *Biology of Sex Differences*. 2016;7(1):67.
44. Black MH, Watanabe RM, Trigo E, Takayanagi M, Lawrence JM, Buchanan TA, et al. High-fat diet is associated with obesity-mediated insulin resistance and β -cell dysfunction in Mexican Americans. *J Nutr*. 2013;143(4):479-85.
45. Camporez JPG, Jornayvaz FR, Lee H-Y, Kanda S, Guigni BA, Kahn M, et al. Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat Diet-Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. *Endocrinology*. 2013;154(3):1021-8.
46. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-35.
47. Fanelli M, Filippi E, Sentinelli F, Romeo S, Fallarino M, Buzzetti R, et al. The Gly482Ser missense mutation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) gene associates with reduced insulin sensitivity in normal and glucose-intolerant obese subjects. *Dis Markers*. 2005;21(4):175-80.
48. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145-51.
49. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2621-37.
50. de la Torre BG, Albericio F. *Peptide Therapeutics 2.0*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.

51. Gewehr MC, Navon A, Ferro ES. Intracellular peptides as drug prototypes. *Peptide and Peptidomimetic Therapeutics*: Elsevier; 2022. p. 255-89.
52. Buyanova M, Pei D. Targeting intracellular protein-protein interactions with macrocyclic peptides. *Trends Pharmacol Sci*. 2021.
53. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF. Trends in peptide drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(4):309-25.
54. Zizzari AT, Pliatsika D, Gall FM, Fischer T, Riedl R. New perspectives in oral peptide delivery. *Drug Discovery Today*. 2021;26(4):1097-105.
55. Silvério R, Barth R, Heimann AS, Reckziegel P, Dos Santos GJ, Romero-Zerbo SY, et al. Pep19 Has a Positive Effect on Insulin Sensitivity and Ameliorates Both Hepatic and Adipose Tissue Phenotype of Diet-Induced Obese Mice. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8).
56. Silva RNO, Llanos RP, Eichler RAS, Oliveira TB, Gozzo FC, Festuccia WT, et al. New Intracellular Peptide Derived from Hemoglobin Alpha Chain Induces Glucose Uptake and Reduces Blood Glycemia. *Pharmaceutics*. 2021;13(12).
57. Menche J, Sharma A, Kitsak M, Ghiassian SD, Vidal M, Loscalzo J, et al. Disease networks. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science*. 2015;347(6224):1257601.
58. Sharma A, Menche J, Huang CC, Ort T, Zhou X, Kitsak M, et al. A disease module in the interactome explains disease heterogeneity, drug response and captures novel pathways and genes in asthma. *Hum Mol Genet*. 2015;24(11):3005-20.
59. Sahni N, Yi S, Zhong Q, Jaikhani N, Charlotiaux B, Cusick ME, et al. Edgotype: a fundamental link between genotype and phenotype. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23(6):649-57.

60. Vidal M, Cusick ME, Barabasi AL. Interactome networks and human disease. *Cell*. 2011;144(6):986-98.
61. Goh K-I, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabási A-L. The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(21):8685-90.
62. Heimann AS, Gomes I, Dale CS, Pagano RL, Gupta A, de Souza LL, et al. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20588-93.
63. Cunha FM, Berti DA, Ferreira ZS, Klitzke CF, Markus RP, Ferro ES. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(36):24448-59.
64. Machado MF, Cunha FM, Berti DA, Heimann AS, Klitzke CF, Rioli V, et al. Substrate phosphorylation affects degradation and interaction to endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(2):520-5.
65. Heimann AS, Favarato MH, Gozzo FC, Rioli V, Carreno FR, Eberlin MN, et al. ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight. *Physiol Genomics*. 2005;20(2):173-82.
66. Parada CA, de Oliveira IP, Gewehr MCF, Machado-Neto JA, Lima K, Eichler RAS, et al. Effect of FKBP12-Derived Intracellular Peptides on Rapamycin-Induced FKBP-FRB Interaction and Autophagy. *Cells*. 2022;11(3).
67. Russo LC, Asega AF, Castro LM, Negraes PD, Cruz L, Gozzo FC, et al. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3epsilon and calmodulin. *Proteomics*. 2012;12(17):2641-55.

68. Gewehr MCF, Teixeira AAS, Santos BAC, Biondo LA, Gozzo FC, Cordibello AM, et al. The Relevance of Thimet Oligopeptidase in the Regulation of Energy Metabolism and Diet-Induced Obesity. *Biomolecules*. 2020;10(2):E321.
69. Gewehr MCF, Silverio R, Rosa-Neto JC, Lira FS, Reckziegel P, Ferro ES. Peptides from Natural or Rationally Designed Sources Can Be Used in Overweight, Obesity, and Type 2 Diabetes Therapies. *Molecules*. 2020;25(5).
70. de Araujo CB, Heimann AS, Remer RA, Russo LC, Colquhoun A, Forti FL, et al. Intracellular Peptides in Cell Biology and Pharmacology. *Biomolecules*. 2019;9(4).
71. Castro LM, Cavalcanti DM, Araujo CB, Rioli V, Icimoto MY, Gozzo FC, et al. Peptidomic analysis of the neurolysin-knockout mouse brain. *J Proteomics*. 2014;111:238-48.
72. Farr OM, Li CR, Mantzoros CS. Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging. *Metabolism*. 2016;65(5):699-713.
73. Schwartz MW, Porte Jr D. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*. 2005;307(5708):375-9.
74. Santos NBD, Franco RD, Camarini R, Munhoz CD, Eichler RAS, Gewehr MCF, et al. Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15) Key Functions Suggested by Knockout Mice Phenotype Characterization. *Biomolecules*. 2019;9(8).