

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**Dissertação de Mestrado**

Poliana Espíndola Correia

**PERFIL METABÓLICO DE CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA O RECEPTOR  
B1 DE CININAS SUBMETIDOS À DIETA DE CAFETERIA**

Porto Alegre, 2018

Poliana Espíndola Correia

**PERFIL METABÓLICO DE CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA O RECEPTOR  
B1 DE CININAS SUBMETIDOS À DIETA DE CAFETERIA**

Dissertação de mestrado  
apresentada ao programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas:  
Endocrinologia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito para obtenção do  
título de mestre.

Orientador: Prof. PhD Fernando Gerchman  
Co- orientador: Prof. PhD Carlos Castilhos de Barros

Porto Alegre, 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

Correia, Poliana Espindola  
PERFIL METABÓLICO DE CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA  
O RECEPTOR B1 DE CININAS SUBMETIDOS À DIETA DE  
CAFETERIA / Poliana Espindola Correia. -- 2018.  
73 f.  
Orientador: Fernando Gerchman.  
  
Coorientador: Carlos Castilho de Barros.  
  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.  
  
1. Obesidade. 2. Sistema Calicreina-Cininas. 3.  
Receptor B1 de Cininas. 4. Função de Células Beta. I.  
Gerchman, Fernando, orient. II. Barros, Carlos  
Castilho de, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## FOLHA DE APROVAÇÃO

*Dedico este trabalho a todos aqueles que o destino e a vida pediram para embarcar em busca dos seus sonhos, se distanciando dos que mais amam e pagando o alto preço de viver longe de casa. Nós que viemos, não estamos livres do medo e de tantas fraquezas, mas estamos para sempre livres do medo de nunca termos tentado.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Eu tenho em mim todos os sonhos do mundo e por sonhar alto, hoje venho aos que me deram asas para voar.*

A minha tia Rosângela, por ser minha mãe e meu pai. Por acreditar nos meus sonhos e pelo apoio incondicional nas minhas escolhas. Obrigada por ser essa mulher incrível e por fazer de mim a pessoa que sou hoje. Eu sei que nada que um dia eu fizer vai compensar tudo que fazes por mim. Não existe expressão capaz de demonstrar tanta gratidão, obrigada por tudo.

Ao meu orientador Prof. Fernando Gerchman, por acreditar em mim sem me conhecer e ter me concedido o imenso privilégio de ser sua orientanda. Gostaria de agradecer-lhe pela orientação, conhecimento, incentivo e compreensão durante o desenvolvimento dessa dissertação, sempre sabendo pesar exigência e humanidade. Obrigada por servir como referência de pesquisador e ser humano. Seus ideais, valores, entusiasmo e otimismo tiveram e continuarão a ter uma influência notável em toda a minha vida e carreira. Gostaria de expressar minha eterna gratidão.

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Castilhos de Barros, por fazer eu me apaixonar pela pesquisa, por todos os ensinamentos e por abraçar as minhas idéias. Se eu nunca desisti, se eu firmei meus passos, se eu cheguei tão longe foi pela tua ajuda, teu incentivo e persistência. Saiba que tens uma contribuição imensurável nessa conquista, ela também é sua. Obrigada pela amizade e por nunca desistir de mim. Obrigada por tudo.

À Marlene Gaier, por me receber em Porto Alegre com tanto amor e ternura. Obrigada por teres me permitido entra na tua casa e na tua vida.

Aos meus amigos, próximos e distantes, pelo suporte nessa caminhada. Em especial à May, que mesmo longe, está comigo todos os dias. Ao Douglas, meu pra sempre melhor amigo e à Livia por ter sido a minha família longe de casa durante esses anos.

Às minhas colegas de grupo e pós-graduação, Carina, Raquel e Ana, pela convivência, ensinamentos e trocas.

Às pessoas que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, em especial à Clarissa, Vinicius e Thaís, por terem conduzido tão bem os meus experimentos na minha ausência, minha eterna gratidão. À Paula e Gabi pelo suporte na escrita.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pela parceria, risadas e por fazer essa experiência tão prazerosa. Agradeço em especial a Denise pelo ombro amigo sempre que precisei, a Dra. Daisy pela disponibilidade em me ensinar e a Nath pela ajuda nos meus experimentos.

À CAPES que propiciou, na graduação, no intercâmbio e no mestrado suporte financeiro para que eu pudesse seguir.

Aos colegas, funcionários e professores do Serviço de Endocrinologia por terem tornado o meu mestrado uma experiência tão enriquecedora, leve e gratificante. Por aumentarem o meu amor pela pesquisa e acima de tudo pelos ensinamentos.

## RESUMO

A obesidade é um distúrbio da homeostasia energética de etiologia multifatorial que pode levar ao desenvolvimento de comorbidades, tais como, diabetes, hipertensão e síndrome metabólica. Entender os fatores que desencadeiam essa patologia pode resultar no desenvolvimento de tratamentos tanto curativos como preventivos. A desregulação de vários sistemas fisiológicos que estão envolvidos na ativação de vias metabólicas relacionadas a processos que levam ao ganho de peso e/ou ao desenvolvimento das complicações relacionadas. Dentro destes, o sistema caliceína-cinina (SCC) tem sido mostrado como importante na regulação da sensibilidade à leptina, sensibilidade à ação e secreção da insulina e cascata inflamatória.

O SCC é formado por uma via metabólica envolvida em inúmeros processos biológicos, tais como regulação da pressão arterial, inflamação, resistência à insulina e metabolismo energético, cujos efetores são peptídeos chamados de cininas. As principais cininas em humanos são bradicinina e seu metabólito, des-Arg9-bradicinina, sendo formados a partir da clivagem do cininogênio pela ativação de uma classe de enzimas denominadas caliceínas. Uma vez formadas, as cininas irão ativar dois receptores de membrana acoplados à proteína G, denominados B1 e B2. O receptor B2 (BDKB2R) é constitutivamente expresso nos tecidos, enquanto o receptor B1 (BDKB1R) tem um baixo nível de expressão na maioria dos tecidos, sendo sua expressão induzida por inflamação. Evidências recentes têm demonstrado que além de seus efeitos vasoativos, o SCC também está envolvido na regulação do metabolismo energético. Isso foi evidenciado através de experimentos com uso de animais nocaute para os receptores B1 e B2. O BDKB1R demonstrou desempenhar um papel importante na modulação da sensibilidade à insulina além de estar



envolvido em outras vias metabólicas relacionados à leptina e ao metabolismo hepático.

A dieta de cafeteria (CAF) consiste em uma dieta composta por alimentos altamente palatáveis com alto teor calórico. O modelo consiste em acrescentar, associar ou substituir a ração padrão para roedores por alimentos calóricos consumidos por humanos, como chocolate, amendoim, salsichas, leite condensado, bolo, biscoitos, refrigerante, entre outros, oferecidos *ad libitum*. A CAF é composta principalmente por carboidratos simples, açúcares refinados, alto teor de gordura saturadas e/ou trans, e baixo teor de proteínas, micronutrientes e fibras. Além de ser pobre em nutrientes, a dieta de cafeteria possui uma alta palatabilidade, tendo como consequência uma hiperfagia voluntária, onde os animais podem ter um consumo de calorias de 30 a 40% maior quando comparados com animais alimentados com dieta rica em lipídios, o que leva a uma exacerbação das disfunções metabólicas.

Entretanto, apesar do exposto acima, até o momento não existem estudos que tenham avaliado os efeitos da dieta de cafeteria no metabolismo de animais deficientes para o receptor B1 de cininas. Dessa forma, a presente dissertação foi constituída a fim de avaliar esses mecanismos, sendo constituída de duas partes. A primeira de um referencial teórico sobre o tema e a segunda de um estudo experimental que avaliou os efeitos da dieta CAF no metabolismo de animais deficientes para o receptor B1 de cininas.

## ABSTRACT

Obesity is a disorder of energy homeostasis with multifactorial etiology that can lead to the development of comorbidities, such as diabetes, hypertension and metabolic syndrome. Understanding the factors that trigger this pathology can result in the development of curative and preventive treatments. The deregulation of several physiological systems, that are involved in the activation of metabolic pathways related to processes, leads to weight gain and/or the development of related complications. Among these, the kallikrein-kinin system (KKS) has been shown to be important in regulation of leptin sensitivity, action and secretion of insulin and inflammatory cascade.

Kalikein-Kinin system is a metabolic pathway involved in numerous biological processes, such as blood pressure regulation, inflammation, insulin resistance, and energy metabolism, having the kinins peptides as effectors. . The main kinins in humans are bradykinin and its metabolite, des-Arg9-bradykinin, being formed from the cleavage of cininogen by the activation of a class of enzymes called kallikreins. Once formed, the kinins will activate two G protein coupled receptors, called B1 and B2. The B2 receptor (BDKB2R) is constitutively expressed in tissues, whereas the B1 receptor (BDKB1R) has a low level of expression in most tissues, and its expression is induced by inflammation. Recent evidence has shown that in addition to its vasoactive effects, KKS is also involved in the regulation of energy metabolism. This was evidenced by experiments using knockout animals for B1 and B2 receptors. BDKB1R has been shown to play an important role in the modulation of insulin

sensitivity and to be involved in other metabolic pathways related to leptin and hepatic metabolism.

The cafeteria diet (CAF) consists of a diet composed of highly palatable foods with high caloric content. The model consists of add, associate or replace the standard chow for rodents with caloric foods consumed by humans, such as chocolate, peanuts, sausages, condensed milk, cake, cookies, soft drinks, among others, offered *ad libitum*. CAF is composed mainly of simple carbohydrates, refined sugars, high saturated and/or trans fats, and low protein, micronutrient and fiber content. In addition to being poor in nutrients, the CAF diet has a high palatability, resulting in a voluntary hyperphagia, where the animals can have a calorie consumption 30 to 40% higher when compared to animals fed a diet rich in lipids, which leads to an exacerbation of metabolic dysfunctions.

However, despite the exposed above, to date there are no studies that have evaluated the effects of the cafeteria diet on the metabolism of knockout animals to the B1 kinin receptor. Thus, the present dissertation was constituted in order to evaluate these mechanisms, being constituted of two parts. The first is a background of the subject and the second one is an experimental study that evaluated the effects of the CAF diet on the metabolism of kinin B1 receptor knockout mice.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Table 1.</b> Dietary Characteristics of the Experiment.....	68
--	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Representação esquemática resumida da via de sinalização dos receptores B1 e B2 de cininas.....41

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** Weight Parameters.....68

**Figure 2.** Glycemic Analysis.....69

**Figure 3.** .....71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS: PORTUGUÊS

B1R	Receptor B1 de cininas
B2R	Receptor B2 de cininas
CAF	Dieta de cafeteria
CEEA	Conselho de ética e experimentação em animais
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo II
ECA	Enzima conversora de angiotensina
GEE	Equações de Estimativas Generalizadas
HCPA	Hospital de Clinicas de Porto Alegre
HFD	Dieta rica em lipideos
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IR	Resistência à insulina
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa-B
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTG	Teste de tolerância a glicose
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS: INGLÊS

ACE	Angiotensin-converting enzyme
Arg	Arginine
AUC	Area under the curve
B1R	Kinin B1 receptor
B1RKO	Kinin B1 receptor knock out
B2R	Kinin B2 receptor
BK	Bradykinin
BW	Body Weight
CAF	Cafeteria Diet
DBK	Des-Arg- Bradykinin
Gly	Glycine
GTT	Glucose tolerance test
HFD	High fat diet
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
HOMA	Homeostatic model assessment
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
ITT	Insulin tolerance test
Kcal	Kilocalories
Kitt	Constant rate of glucose disappearance
KKS	Kalikrein-kinin system
LMWK	Low Molecular Weight Kininogen
Lys-BK	Lys- Bradykinin

NaCl	Sodium chloride
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD activity score
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NF-kB	Nuclear factor kappa-B
PMSF	Phenylmethanesulphonyl fluoride
Pro	Proline
RNA	Ribonucleic acid
SC	Standard chow
SCC	Sistema Caliceína-cinina
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Polyacrilamide gel eletrophoresis
SEM	Standard error of the mean
Ser	Serine
Tris-HCl	Tromethamine Hydrochloride
UI	International units
UV	UltraViolet
WT	Wild-Type



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem [Percentage]
±	Mais ou menos [More or less]
≥	Maior ou igual [Bigger or equal]
=	Igual [Equal]
g	gramas [grams]
Kg	Quilograma [kilograms]
min	Minutos [minutes]
mM	Milimolar [Millimolar]

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 OBESIDADE .....	20
1.2 SISTEMA CALICREÍNA-CININA (SCC) .....	23
1.3 DIETA DE CAFETERIA (CAF) .....	26
2. OBJETIVOS .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>CAPÍTULO II – ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
INTRODUCTION .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
METHODS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
ANIMALS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
EXPERIMENTAL DIETS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<i>Standard diet</i> .....	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
<i>Cafeteria diet</i> .....	<b><i>Erro! Indicador não definido.</i></b>
EXPERIMENTAL DESIGN .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
FOOD INTAKE, TOTAL LIQUID INTAKE AND BODY WEIGHT .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
ASSESSMENT OF INSULIN SENSITIVITY, PERIPHERAL GLUCOSE UPTAKE AND B-CELL FUNCTION .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
EUTHANASIA .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
BIOCHEMICAL ANALYSIS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
HISTOLOGICAL ANALYSIS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
WESTERN BLOT .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
STATISTICAL ANALYSIS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
RESULTS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
CALORIC INTAKE OF WT AND B1RKO MICE ACCORDING TO CAFETERIA AND STANDARD DIETS.....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
WEIGHT GAIN ACCORDING TO GENOTYPE AND DIET .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
LACK OF B1R IMPROVES GLUCOSE METABOLISM IN MICE FED WITH CAFETERIA DIET .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE LIVER .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
WESTERN BLOT ANALYSIS OF THE LIVER .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
DISCUSSION .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## **CAPÍTULO I – Referencial Teórico**

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Obesidade

A obesidade é um distúrbio da homeostase energética de etiologia multifatorial que pode levar ao desenvolvimento de comorbidades, dentre elas hipertensão arterial sistêmica, síndrome metabólica e diabetes (1). A etiologia da obesidade é complexa, envolvendo genética, fatores ambientais, comportamentais e um desequilíbrio energético a longo prazo (2,3).

O consumo de dietas pobres em nutrientes, ricas em gorduras saturadas e/ou trans e bebidas açucaradas, estão entre os fatores ambientais mais importantes na predisposição à obesidade em sociedades ocidentais (4,5). Uma das formas de avaliar o impacto desse tipo de dieta é a utilização de modelos animais para o estudo da obesidade (6). Em estudos com modelos de obesidade genética e induzida por dieta, a indução de uma resposta inflamatória sistêmica leva a desregulação de hormônios envolvidos na homeostasia energética, o que resulta em um controle deficiente da ingestão de alimentos e o desencadeamento de comorbidades, como por exemplo o diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2).

O DM tipo 2 caracteriza-se por hiperglicemia, resultante de alterações na produção e utilização da insulina, hormônio responsável pelo adequado controle da síntese e captação de glicose (7). Um dos principais mecanismos patológicos no desenvolvimento do DM tipo 2 é a resistência à insulina, que é caracterizada pela diminuição da captação de glicose pelas células (8,9). O aumento da resistência à insulina, acompanhado da diminuição da função de células  $\beta$ , leva a estado de hiperglicemia, característica principal do DM tipo 2 (9,10).

A hipertrofia do tecido adiposo leva a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- $\alpha$ , o qual a hiperprodução está diretamente relacionada tanto à hipertrofia do tecido adiposo como à infiltração de macrófagos nesse tecido. Independentemente do mecanismo que causa o aumento da síntese de TNF- $\alpha$ , diversos estudos evidenciaram que as citocinas parecem ter papel importante na fisiopatologia do DM tipo 2, inibindo a sinalização das vias de produção da insulina, alteração da expressão gênica e síntese dos transportadores da glicose, levando a diminuição da captação e metabolização da glicose (11,12)

O acúmulo de gordura corporal leva a resistência à ação da insulina, levando a uma resposta biológica menor da insulina em relação a suas ações no tecido adiposo, muscular e hepatócito (13). No entanto, estudos tem demonstrado que indivíduos obesos são capazes de manter os níveis de glicemia normais, mesmo com uma maior resistência à ação da insulina (menor sensibilidade). Isso é possível pelo incremento na produção desse hormônio através de uma hiperativação das células beta em resposta a menor sensibilidade, demonstrando-se uma relação curvilínea e hiperbólica entre estes parâmetros gerando uma constante que é o produto da secreção da insulina ajustada para os níveis de sensibilidade à insulina, expressa através do cálculo do “Disposition Index” ou função de célula  $\beta$  relativa para os níveis de sensibilidade à insulina. Assim sendo, por exemplo, assumindo que dois indivíduos tem um mesmo valor de parâmetro estimado de função de célula  $\beta$  terão funções de célula  $\beta$  completamente distintas se tiverem diferentes valores de um parâmetro de sensibilidade a insulina, sendo esse um preditor importante para o desenvolvimento do diabetes (14,15).

Muitos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa patologia ainda não foram completamente elucidados. Anormalidades em diversas vias metabólicas

envolvendo múltiplos órgãos estão envolvidas no desenvolvimento da obesidade e do DM tipo 2. Dentro desses, o SCC tem se mostrado como importante na regulação da homeostase da glicose (16–18), na secreção de insulina (17,19) e na sensibilidade a leptina (20,21). Entender os fatores que desencadeiam essa patologia e os envolvidos na sua fisiopatologia pode resultar no desenvolvimento de intervenções com o objetivo de prevenir e tratar a doença.

## 1.2 Sistema Calicreína-Cinina (SCC)

O SCC é uma importante família de mediadores inflamatórios e que estão envolvidos em inúmeros processos biológicos, tais como, regulação da pressão arterial, inflamação, edema, resistência à dor e resistência à insulina (22–26). Seus principais efetores são peptídeos denominados cininas, que são formados no plasma e nos tecidos a partir da clivagem do cininogênio, pela ativação de uma classe de enzimas denominadas calicreínas. (27,28). As duas principais cininas encontradas em roedores são a bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e seu metabolito a des-Arg<sup>9</sup>-bradicina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe) (27).

Existem dois tipos de cininogênio no plasma de mamíferos, denominados de cininogênio de baixo peso molecular (LMWK) e cininogênio de alto peso molecular (HMWK) (28). Os cininogênios são os únicos precursores do SCC e são codificados por um único gene (29), sendo sintetizados primariamente nos hepatócitos e secretados diretamente na corrente sanguínea. Podem também ser sintetizados nas células epiteliais do túbulo renal e em algumas células neurais no cérebro (28). Embora exerça inúmeras funções na coagulação sanguínea, fibrinólise e angiogênese (30), o maior papel fisiológico do cininogênio é atuar como precursor das cininas. O cininogênio é clivado, no plasma e nos tecidos, por enzimas denominadas calicreínas. Em humanos, a calicreína plasmática forma bradicinina a partir do HMWK enquanto a calicreína tecidual forma calidina a partir do LMWK (31), ambas possuem propriedades biológicas similares. Em contraste, em roedores, tanto a calicreína plasmática quanto a tecidual geram bradicinina (27).

Uma vez formadas, as cininas ativam dois receptores de membrana acoplados à proteína G, denominados receptores B1 e B2 (Figura 1) (32,33). A bradicinina exerce os seus efeitos se ligando diretamente ao receptor B2 (BDKB2R)

ou pode sofrer a ação da enzima cininase I, que quebra a arginina da porção carboxiterminal deste peptídeo, dando origem a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina que é capaz de ativar outro receptor, denominado B1R (BDKB1R). A bradicinina é degradada rapidamente in vivo (34), e sua degradação é feita principalmente pela enzima conversora de angiotensina (ECA), também chamada de cininase II, que remove o peptídeo c-terminal Phe-Arg, dando origem a um peptídeo inativo (35,36).

O receptor B2R é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos centrais e periféricos, como células da musculatura lisa e células endoteliais, e é o responsável pelas principais ações do SCC (37). Por outro lado, a expressão do receptor B1 (BDKB1R) é induzida por inflamação ou por dano tecidual (22). Um dos moduladores da expressão do BDKB1R é o fator nuclear kappa-B (NF-κB), que controla a expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e adesão celular (38). A citocina pró-inflamatória interleucina 1β (IL-1β) é o indutor ideal da expressão do receptor BDKB1R, contudo, outros mediadores pró-inflamatórios, como TNF-α e interferon-gamma (IFNγ) também são efetivos em regular a sua expressão. Uma vez ativado o receptor BDKB1R atua no processo inflamatório aumentando a migração de neutrófilos e citocinas pro inflamatórias IL-1β e TNF-α, exercendo assim uma alça de regulação positiva na sua expressão (39–41). Estes achados sugerem que a expressão de BDKB1R pode ser continuamente auto amplificada, não sofrendo dessensibilização pelas cininas ao longo do tempo. Essa interação entre citocinas e o BDKB1R pode desempenhar um papel importante na manutenção de uma resposta inflamatória crônica (42).

Estudos têm demonstrado que além de seus efeitos vasoativos e no processo inflamatório, o SCC também está envolvido na regulação do metabolismo glicêmico



e energético. Esses efeitos foram demonstrados através de experimentos com uso de animais nocaute para os receptores BDKB1R e BDKB2R e com uso de bloqueadores farmacológicos. Esses estudos foram realizados utilizando modelos genéticos em obesidade, camundongos [*ob/ob*] (19,43), e modelos animais de obesidade induzida por dieta rica em lipídios (HFD) (44,45).

A habilidade do BDKB1R em regular a liberação de citocinas se mostrou importante no processo de insulinite (46). O tratamento crônico com um antagonista BDKB1R ([Lue]<sup>8</sup> des-Arg<sup>9</sup> -BK em animais que possuíam diabetes induzida por estreptomicina preveniu a ocorrência de DM tipo 1 diminuindo a glicemia em 50% comparado com os controles, além de reduzir a albuminúria, um resultado semelhante ao encontrado em animais que foram tratados com insulina. O tratamento prolongado (10 dias) com o antagonista do receptor B1 preveniu o desenvolvimento de hiperglicemia (46).

Um estudo usando camundongos duplo nocautes para o receptores B1 e B2, deficientes em leptina, um modelo comum de obesidade severa e DM tipo 2, demonstrou que na ausência de ambos os receptores de cininas, as ilhotas isoladas de camundongos de 3 meses produziram 3 vezes mais insulina que os controles, mecanismo sugerido como responsável por manter a glicemia normal e a curva glicêmica similar no teste de tolerância a glicose (TTG) desses animais em comparação com os controles (19). Por outro lado, outro estudo demonstrou que camundongos deficientes para o receptor B1, em condições normais, apresentaram uma menor liberação de insulina e uma maior sensibilidade periférica a esse hormônio (17).

Além do papel do receptor B1 na modulação da sensibilidade a insulina, esse receptor está envolvido em outras vias metabólicas relacionados à leptina

(20,21,43). Camundongos com a deleção genética do BDKB1R demonstraram melhora na sensibilidade sistêmica à leptina e resistência contra obesidade induzida por dieta rica em lipídeos (44). Mais recentemente, Fonseca *et al* (2013) demonstraram que animais nocautes para o receptor B1 parecem ter maior versatilidade na adaptação metabólica a condições diversas com relação ao metabolismo hepático (20). Em um outro modelo animal, o bloqueio farmacológico do receptor B1 protegeu ratos contra a obesidade e a resistência à insulina (47).

Estes estudos demonstram que a ativação desse receptor predispõe a resistência à insulina, ativação de processos inflamatórios, desenvolvimento de obesidade e anormalidade da homeostase glicêmica. No entanto esses efeitos dependem de inúmeros processos biológicos e fisiopatológicos. Dessa forma, diferentes dietas poderiam servir de modelo de estudo para melhor entender como diferentes estímulos ativam esse sistema, resultando em diferentes respostas metabólicas nesses animais e que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de obesidade e diabetes nos seres humanos. Dessa forma, os efeitos da deleção/ativação dos receptores de cininas no metabolismo depende do modelo animal estudado, do tipo de dieta e/ou tratamento farmacológico. Além disso, a ativação/deleção do receptor B1 pode afetar tecidos específicos de uma maneira diferente.

..

### **1.3 Dieta de Cafeteria (CAF)**

A CAF consiste em uma dieta composta por alimentos altamente palatáveis com alto teor calórico. O protocolo experimental da dieta de cafeteria varia entre autores. O modelo consiste em acrescentar, associar ou substituir a ração padrão para roedores por alimentos calóricos consumidos por humanos, como chocolate, amendoim, salsichas, leite condensado, bolo, biscoitos, refrigerante, entre outros, oferecidos *ad libitum* (48,49). A CAF é composta principalmente por carboidratos simples, açúcares refinados, alto teor de gordura saturadas e/ou trans, e baixo teor de proteínas, micronutrientes e fibras (48,49). Além de ser pobre em nutrientes, a dieta de cafeteria possui uma alta palatabilidade, tendo como consequência uma hiperfagia voluntária (49,50), onde os animais podem ter um consumo de calorias de 30 a 40% maior quando comparados com animais alimentados com dieta rica em lipídios (51), predispondo o animal ao desenvolvimento da obesidade, diabetes e distúrbios do metabolismo do colesterol (52).

Ratos alimentados com dieta CAF apresentam níveis elevados de glicose e resistência à insulina, além de inflamação crônica no tecido adiposo e no fígado. Além disso, foram observadas alterações na arquitetura das ilhotas pancreáticas desses animais e infiltração gordurosa no pâncreas (51,53). Outros estudos demonstraram o aumento dos níveis de leptina e adiponectinas (52) no tecido adiposo e interleucina 6 (IL-6), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no fígado quando comparados com controles magros (54). Ratos alimentados com dieta de cafeteria também apresentaram aumento do stress oxidativo intestinal, que não foi observado nos controles obesos que não receberam a dieta. Esse resultado demonstrou a importância da ingestão de açúcar refinado e gorduras saturadas no estresse oxidativo intestinal, não estando isto relacionado a obesidade (55).

Com base em estudos comparativos, entre diferentes tipos de dietas indutoras de obesidade, a CAF apresenta melhores resultados como modelo em síndrome metabólica (51,56) Além disso, o rápido início no ganho de peso, a obesidade, as disfunções em múltiplos órgãos e as patologias observadas com o uso da dieta CAF estão mais próximas às condições observadas no desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica em humanos do que, por exemplo, a dieta rica em lipídios (51,57).

A natureza dos macronutrientes em uma dieta obesogênica é também provável que seja importante na gênese e na severidade da resposta inflamatória. Sendo, no entanto, dietas experimentais, com base nas dietas de cafeteria, bastante utilizada em pesquisas experimentais em modelo animal para elucidar os possíveis efeitos nos parâmetros bioquímicos, inflamatórios e moleculares causados em seres humanos. Nesse contexto, esse tipo de dieta, utilizada em animais, vem se tornando um modelo com grande utilidade para estudos que tratam da obesidade humana e suas comorbidades, na medida em que uma alta ingestão de gordura e de açúcares está ligada com a desregulação da homeostase metabólica determinante no desenvolvimento dessa patologia.

Tendo em vista o papel da alimentação no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades, como o DM tipo 2, e considerando os achados recentes a respeito do papel do receptor B1 na modulação do metabolismo, faz-se necessário um estudo do papel desse receptor em um modelo animal de obesidade que mimetize o padrão alimentar da sociedade ocidental, no caso, a dieta de cafeteria.

O entendimento dos mecanismos pelos quais o receptor B1 age na modulação do metabolismo energético pode levar à identificação de mecanismos

fisiopatológicos da obesidade e do diabetes, bem como pode ser potencialmente importante para a prevenção, tratamento da obesidade, do diabetes e de suas complicações.

## **OBJETIVOS**

### **1.4 Objetivo Geral**

**2.1.1** Analisar a influência do receptor B1 de cininas no desenvolvimento da obesidade e da hiperglicemia em camundongos submetidos à dieta de cafeteria.

### **1.5 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Analisar o efeito da dieta de cafeteria em camundongos deficientes para o receptor B1 no ganho de peso e na composição corporal.

**2.2.2** Analisar efeito da dieta de cafeteria em camundongos deficientes para o receptor B1 submetidos à dieta de cafeteria nos níveis de glicose, insulina, na sensibilidade à insulina e na função de célula  $\beta$  pancreática.

**2.2.3** Analisar efeito da dieta de cafeteria em camundongos deficientes para o receptor B1 submetidos à dieta de cafeteria no desenvolvimento de doença hepática gordurosa.

