

IMPORTÂNCIA DO RECEPTOR B1 DE CININAS NA REDUÇÃO DA GLICONEOGENÊSE EM CAMUNDONGOS OBESOS

THAIS MARTEN¹; RENATA ZANELLA²; EVELISE SAMPAIO²; POLIANA ESPÍNDOLA CORREIA²; CARLOS CASTILHO DE BARROS³

¹Universidade Federal de Pelotas – thsmarten@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rznutri@gmail.com/evelise_sampaio@hotmail.com/espindola.poliana@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – barroscapel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O sistema calicreínas-cininas (SCC) está ligado à vários processos fisiológicos, bem como na captação de glicose em tecido esquelético e no tecido adiposo branco (FONSECA et al., 2013). As cininas são um grupo de peptídeos que incluem a bradicinina, a calidina e seus metabolitos. Estes peptídeos exercem o seu efeito biológico pela ativação de dois subtipos de receptores, B1 e B2 (DRAY e PERKINS, 1993; KISHI et al., 1998). Os mecanismos de segundos mensageiros intracelulares envolvidos na ativação desses receptores vêm sendo também amplamente estudados, devido a sua possível ligação com efeitos metabólicos (DUKA et al., 2001; ARAUJO et al., 2006; TSCHOPE e WESTERMANN, 2008; MORI et al., 2008). Previamente, em um trabalho publicado por BARROS et al. (2012), foi verificado que animais nocautes B2KO, assim como os nocautes para ambos receptores apresentaram um aumento na gliconeogênese. Estes animais também apresentaram anomalias hepáticas como o aumento da esteatose e alterações na produção/liberação de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas.

O objetivo do presente estudo é avaliar parâmetros relacionados a homeostase glicêmica em animais nocaute para o gene da leptina assim como para o receptor B1 de cininas (*ob/ob* B1KO).

2. METODOLOGIA

2.1. Modelos Biológicos

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 nocautes para leptina e para receptor B1 de cininas (*ob/ob* B1KO) obtidos por cruzamento (BARROS et al., 2009; ELLET et al., 2009). Os animais foram mantidos no Laboratório de Nutrição Experimental em estantes ventiladas, sob temperatura (22±2°C) e umidade (40 – 60%) controladas, recebendo ração comercial padrão e água.

2.2. Análises Glicêmicas

Foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG) e o teste de resistência à insulina (TRI). Os níveis glicêmicos foram dosados com jejum prévio de 12 horas utilizando glicosímetro (Accu-Chek Advantage I, Roche). Após a leitura basal da glicemia, foi injetado 1mg de glicose (Sigma) por grama de peso do animal via intraperitoneal (i.p.). As dosagens foram realizadas no tempo 0, 30, 60, 120 e 180 minutos. Os mesmos tempos foram usados para a análise de resistência a insulina, onde os animais receberam 20 UI por kg de animal i.p. de insulina recombinante humana Humalog®. No teste do desafio com piruvato, 0,5mg/kg de

piruvato de sódio foi injetado i.p.e a glicemia foi medida nos mesmos tempos dos testes anteriores.

2.3. PCR Quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A expressão de mRNA de receptor B2 do fígado foi determinada por PCR quantitativo em tempo real. Fragmentos detectado foram retirados dos animais e homogeneizados, o RNA total foi isolado usando um kit de purificação de RNA. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de RNA total com transcriptase reversa (Promega), utilizando-se como iniciadores nucleotídeos hexâmeros aleatórios (RH). As curvas padrão para os iniciadores foram geradas para determinar a eficiência de amplificação dos genes alvo e referência. Os níveis de expressão de mRNA de genes de interesse foram normalizados para camundongos *ob/ob* controle (*ob/ob* WT).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao teste de tolerância a glicose foi observado que os animais *ob/ob* B1KO, apresentaram menor concentração de glicose sérica em toda curva em relação ao grupo controle *ob/ob* WT. Conforme mostra a figura 2 o nível de insulina sérica se manteve preservado na análise TRI.

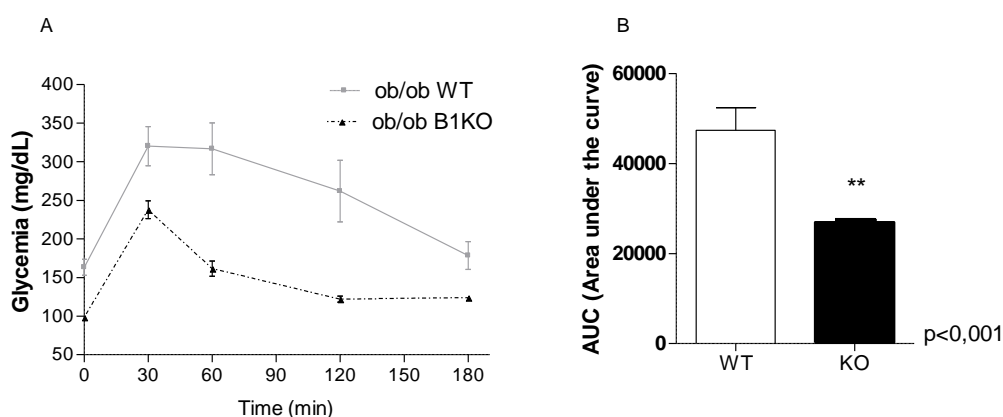


Figura 1. Teste de tolerância a glicose (A) e área abaixo da curva (B) de camundongos machos *ob/ob* WT e *ob/ob* B1KO (n=5). Os dados estão representados em média \pm erro padrão. t-student: **, p < 0,001.

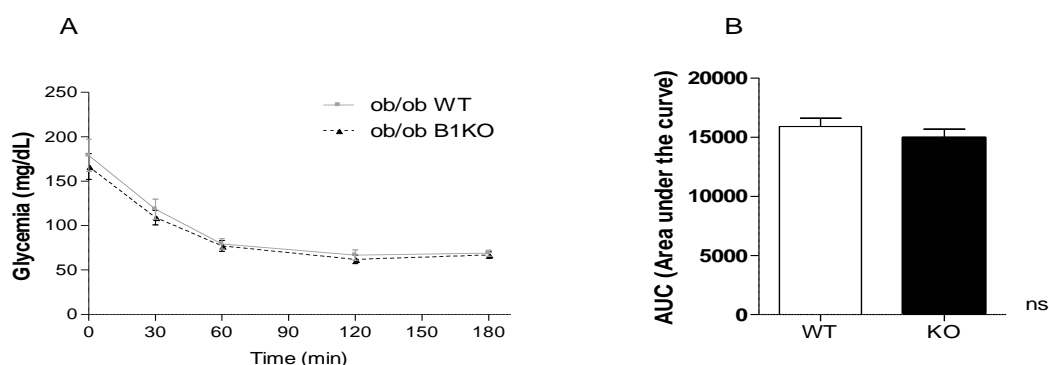


Figura 2. Teste de resistência a insulina (A) e área abaixo da curva (B) em camundongos machos *ob/ob* WT e *ob/ob* B1KO (n=5).

O fígado é um tecido que na condição da falta de glicose (principalmente após longos períodos de jejum) passa a produzi-la por uma via metabólica conhecida como gliconeogênese, porém esta via pode ser ativada em condições patológicas como no caso da resistência a insulina. De acordo com a figura 3, pode ser observado que os animais *ob/ob* B1KO liberam menos glicose na circulação induzida pelo piruvato quando comparado com o grupo *ob/ob* WT.

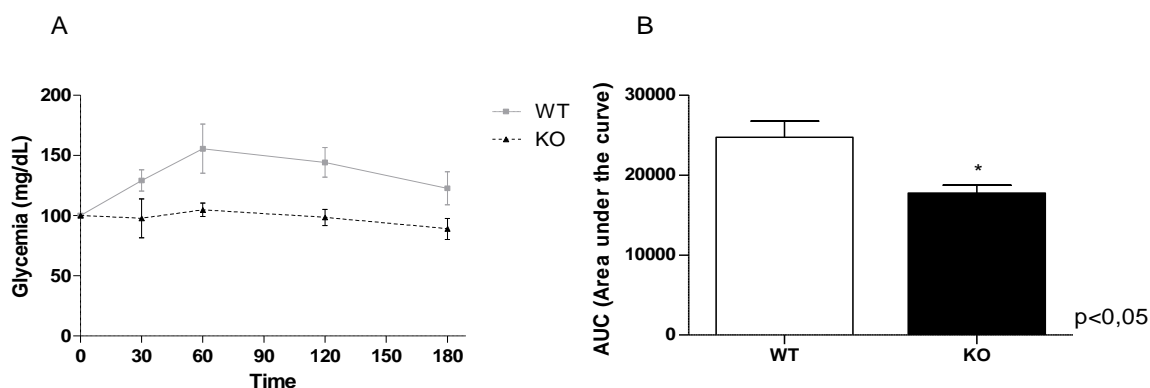


Figura 3. Teste de gliconeogênese (A) área abaixo da curva (B) de camundongos machos *ob/ob* WT e *ob/ob* B1KO (n=5). Os dados estão representados em média \pm erro padrão. t-student: * p < 0,05

Os resultados sugerem que animais *ob/ob* B1KO possuem uma menor glicemia em decorrência de uma menor gliconeogênese hepática. Verificamos se o mecanismo pelo qual o fígado destes animais produz menos glicose pode estar relacionado à expressão do receptor B2KO. Conforme a mostra a figura 4, existe uma tendência em animais *ob/ob* B1KO de uma maior expressão do receptor B2 de cininas, na ausência do receptor B1.

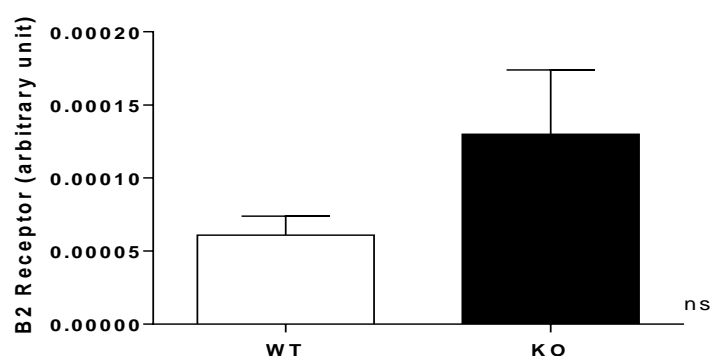


Figura 4. Expressão gênica do receptor B2KO de cininas no fígado de camundongos machos *ob/ob* WT e *ob/ob* B1KO (n=5).

4.CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a diminuição endógena da produção de glicose em camundongos obesos nocautes para o receptor B1 seja causada pelo aumento da expressão do receptor B2 de cininas no fígado destes animais.

Estes resultados corroboram com o papel do receptor B2 como um moderador da gliconeogênese hepática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, CC, ALMEIDA, SS, MORI, MA et al. Efficient method for obtaining Lep(ob)/Lep(ob)-derived animal models using adipose tissue transplantations. **International Journal of Obesity**, v. 33, p. 938–944, 2009.

BARROS, C. C.; HARO, A.; RUSSO, F. J.; SCHADOCK, I.; ALMEIDA, S. S.; REIS, F. C.; MORAES, M. R.; HAIDAR, A.; HIRATA, A. E.; MORI, M.; BACURAU, R. F.; WURTELE, M.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C. Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 10, p. 1419-27, Oct 2012.

DRAY, A. e PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neuroscience**, v.16, n.3, Mar, p.99-104. 1993.

ELLET, J.D.; EVANS, Z.P.; ZHANG, G.; CHAVIN. K.D.; SPYROPOULOS, D.D. A Rapid PCR-based Method for the Identification of ob Mutant Mice. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 402–404, 2009.

FONSECA, R. G.; SALES, V. M.; ROPELLE, E.; BARROS, C. C.; OYAMA, L.; IHARA, S. S.; SAAD, M. J.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. B. Lack of kinin B(1) receptor potentiates leptin action in the liver. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 7, p. 851-60, Jul, 2013.

KISHI, K.; MUROMOTO, N. et al. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. **Diabetes**, v.47, n.4, Apr, p.550-8. 1998.

DUKA I.; SHENOUDA, S.; JOHNS, C.; KINTSURASHVILI, E.; GAVRAS, I.; et al. Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. **Hypertension**, v.38, n.6, p.1355–1360, Dec, 2001.

TSCHOPE, C.; WESTERMANN, D. Development of diabetic cardiomyopathy and the kallikrein-kinin system—new insights from B1 and B2 receptor signaling. **Biological Chemistry**, v. 389, n.6, p. 707–711, Jun, 2008.

MORI, M.A.; ARAUJO, R.C.; REIS, F.C.; SGAI, D.G.; FONSECA, R.G.; et al. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. **Diabetes**, v.57, n.6, p. 1491–1500, Jun, 2008.

ARAUJO, R.C.; MORI, M.A.; MERINO, V.F.; BASCANDS, J.L.; SCHANSTRA, J.P.; et al. Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. **Biological Chemistry**, v.387, n.4, p. 431–436, Apr, 2006.