

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
PONTO FOCAL – UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL

VALÉRIA NUNES DE SOUZA

**Alterações metabólicas decorrentes da deleção gênica da enzima conversora
de angiotensina 2 (ECA2) em camundongos**

Maceió-AL
2014

VALÉRIA NUNES DE SOUZA

**Alterações metabólicas decorrentes da deleção gênica da enzima conversora
de angiotensina 2 (ECA2) em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
RENORBIO como requisito final à
obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luíza A.
Rabêlo
Co-orientador: Prof. Dr. Michael
Bader

**Maceió-AL
2014**

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

S729c Souza, Valéria Nunes de.
Alterações metabólicas decorrentes da deleção gênica da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em camundongos / Valéria Nunes de Souza. – 2014.
158 f. : il. tabs., grafos. e mapas.

Orientadora: Luíza A. Rabêlo.
Co-orientador: Michael Bader.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2014.

Inclui bibliografias.
Anexos: f. 143-158.

1. ECA2 knockout. 2. Sistema renina angiotensina. 3. Esteatose. 4. Lipodistrofia. 5. Obesidade. I. Título.

CDU: 542:612.3

Folha de Aprovação

AUTORA: VALÉRIA NUNES DE SOUZA

Alterações metabólicas decorrentes da deleção gênica da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO e aprovada em 28 de março de 2014.

Profa. Dra. Lúiza Antas Rabêlo – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Michael Bader - Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC-Berlin)-
(Examinador Externo)

Dra. Natalia Alenina - Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC-Berlin)-
(Examinador Externo)

Profa. Dra. Gloria Isolina Boente Pinto Duarte - Departamento de Fisiologia e Farmacologia Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco- (Examinador Externo)

Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)

Prof. Dr. Alessandro Riffel - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (Examinador Interno)

Aos meus pais **Givanildo** (*in memoriam*) e **Fátima**,
pelo amor e cuidado incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Sempre me pergunto o que escrever nesse imprescindível capítulo de uma tese de doutorado, “os agradecimentos”, o que dizer a tantas pessoas que de alguma forma ajudaram-me a hoje finalizar mais uma etapa acadêmica da minha vida. Certamente apenas “obrigada” não é o bastante, mas quando dito/escrito de coração tem muito significado. Espero não esquecer ninguém. Desta forma, já de início agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Bom, resolvi iniciar a escrita deste ainda inspirada em um clássico episódio da série “Lie To Me” no qual a personagem principal tenta escrever um livro, mas não consegue por falta de inspiração. Ao final do episódio, sua filha o ajuda a encontrar a inspiração ao escrever o Prefácio deste. Contudo, minha inspiração não veio apenas deste caso, mas também ao ver um certo alguém tentando fazer o mesmo, escrever. Confesso que é inspirador! Mas, não é apenas isso. Vejo-me talvez, em um momento de reflexão, momento extremamente introspectivo, véspera de Natal, ainda em Berlin, longe de casa, longe dos meus...Na verdade, meu primeiro Natal longe deles, um pouco triste, mas diferente, afinal tenho amigos por perto. Voltando... essas três situações talvez juntas tenham me inspirado a começar meus agradecimentos (mesmo ainda sem cara de agradecimento).

Deveria iniciar agradecendo a Deus e a minha família, afinal a ajuda espiritual e emocional é tão importante quanto à científica quando se faz pós-graduação, mas resolvi separar as categorias. Certamente, diante da importância deles na minha vida, penso que se eu começar por eles eu não acabaria os agradecimentos diante das prováveis lágrimas que rolarão. Assim, começo pelos agradecimentos científicos.

As primeiras linhas vão para minha orientadora, **Profa. Dra. Luíza Antas Rabêlo**. Foi ela que ainda sem me conhecer, aceitou-me no Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC) para um estágio científico, para o mestrado e depois outro mestrado (dois mestradinhos com a mesma orientadora, isso mesmo!) e, na sequência, o doutorado. Há quem me chame de doida, mas confesso que hoje sei a importância para a minha vida de ter feito o outro mestrado. Costumo dizer para Luiza que o primeiro mestrado foi a minha iniciação científica, pela imaturidade ainda persistente em mim ao final deste e pelos tantos percalços no caminho. O

segundo foi, de fato, “O Mestrado”. Então, como parece, foram muitos anos (7 anos até o presente) de orientação e convivência. Muito tenho a agradecer a Prof. Luíza e a Luíza (independente de orientação). Assim como uma mãe briga e discute com seus filhos, a relação orientador-orientando não é diferente. Somos diferentes!, temos opiniões diferentes!, (e isso é o melhor da história!), mas o respeito é imprescindível nesse caso. Claro que não vou aqui dizer que entendo e aceito tudo, mas muitas coisas hoje, advindas da maturidade, eu entendo perfeitamente! Imagino o quanto difícil é formar alguém. Entretanto, hoje também sei que “é preciso viver outros mundos” (como ela costuma dizer em seus discursos). Tive a oportunidade, graças também a ela e já aqui agradeço, de vivê-los e neles me deparei com o que verdadeiramente ela queria dizer naquela frase “é preciso viver outros mundos”. Nossa!, Como é preciso!, para entender e melhorar tantas coisas, mudar conceitos (e preconceitos). Agradeço a você pela orientação durante todos esses ciclos acadêmicos tão importantes e necessários para minha vida profissional, a todo apoio científico (na bancada, na escrita, nas discussões e nos bastidores científicos, os quais sabemos que não são fáceis...), pela ajuda emocional durante os meus momentos de abalo, pelo companheirismo além da orientação. Agradeço pelos sacrifícios dos animais muito bem executados, por me ensinar a fazer praticamente todos os experimentos, em especial ao “Western Blot” e, claro, por ter realizado boa parte das minhas transferências gel-membrana e tão perfeitas! São tantas coisas para agradecer que, certamente, não lembrei tudo, mas quero que saiba que a finalização de mais este ciclo, só foi possível graças também a você e, por isso, e tantos outros, deixo aqui por extenso o meu Muito Obrigada!;

Agradeço ao meu co-orientador **Prof. Dr. Michael Bader** do Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC-Alemanha) pela oportunidade de realizar o “Doutorado Sanduíche” no laboratório por ele coordenado, por todo suporte científico durante minha estada na Alemanha, discussões e correções. Todo apoio e cuidado, principalmente na parte final deste período tão corrido em Berlin, pela ajuda pessoal com a parte burocrática e tantas outras que não seriam fáceis sem a ajuda dele. (*I thank my co-adviser Prof. Dr. Michael Bader, from the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC-Germany), for the opportunity to do my “PhD sandwich” at the laboratory coordinated by him, for all the scientific support during my stay in Germany, for all the learning, discussions and thesis corrections. For all the support*

and care, mainly in the final steps of this period in Berlin, for the personal help with bureaucratic matters and so many other things that would not be easy without his help);

Agradeço a Dra **Natalia Alenina** (MDC-Alemanha) por todo apoio no laboratório na parte experimental realizada no MDC e junto a “*Animal Facility*”, bem como pelas reuniões para discussão do projeto, e por todo o suporte pessoal fora do laboratório;

Agradeço a ajuda direta e a colaboração do **Prof. Dr Robson A.S. Santos** da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) durante minha estada na Alemanha, pelos momentos de conversa tão enriquecedores e de aprendizado;

Ao **Prof. Dr. Mihail Todiras** (MDC-Alemanha) por todo suporte na “*Animal’s House*”, experimentos de telemetria e disfunção endotelial, além da agradável convivência em Berlin;

Aos colaboradores diretos do projeto, **Dra Fatimunnisa Quadri** (MDC-Alemanha) pela parte histológica do trabalho, **Dra Valentina Mosienko** (MDC-Alemanha) pela ajuda com os experimentos envolvendo as gaiolas metabólicas, e **Prof Dr Josef Penninger** (Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria) pelos animais ACE2 knockout. Muito obrigada pela prestimosa colaboração e contribuição de todos vocês;

Aos colaboradores indiretos do AG Bader, aqueles que nos ajudam de alguma forma durante a realização de determinados experimentos, mas que não participam efetivamente do projeto, e, sem eles as coisas seriam bem mais difíceis: **Magdalena Zan** por me apresentar com muita paciência o qPCR e suas análises, **Rafael Moraes** por me ensinar a desenhar *primers* e por tantas discussões frutíferas, **Diogo Cavalcanti** pela doação de alguns *primers* ainda quando eu não sabia desenhá-los, **Gabin Sihn** pelas respostas de tantas dúvidas de bancada e pela convivência tão harmoniosa, **Katrin Nitz** pela doação de protocolo e apoio experimental com o *FACS*, bem como pela maravilhosa convivência em Berlin, juntamente com **Venjamin Fishman, Paola Guimarães e Carlos Alberto** que não

sabem, mas me ajudavam com a maravilhosa e descontraída presença pelos corredores AG Bader, e a todos os técnicos (Susanne Gonçalves, Lisa Mallis, Andrea Mueller, Thorsten Riepenhausen, Cathrin Gerhard, Sabine Grueger, Adelheid Böttger, Tanja Schalow) pela ajuda sempre que precisava na rotina laboral;

Um agradecimento especial ao técnico do MDC “Phenotyping Facility” **Martin Taube** por todas as avaliações de “composição corporal” e paciência com a minha infinidade de grupos experimentais;

Parágrafo especial a **Lucas José Sá da Fonseca**. Ele tanto esteve presente nos bastidores da minha jornada como a sua contribuição nesta foi ímpar. Desde a minha chegada ao LRC à seleção do doutorado. Adiante, na quase finalização deste, ele tem me auxiliado de diferentes maneiras, e aqui destaco a ajuda com suas correções e traduções para o inglês do projeto enviado para o doutorado Sanduíche, dos “abstracts” e dos artigos, com sugestões e ajuda na escrita destes, nas apresentações de trabalho em congresso e a ajuda emocional que ele me proporciona de forma ímpar, é um humorista nato (*heim Lucas, hum???*). Obrigada pela sua ida à Berlin e toda a ajuda experimental e mental a mim ofertadas, somente você sabe o quanto foi importante durante este período. Lucas, sem você certamente tudo seria diferente, bem diferente. Muito obrigada por fazer parte de tudo isso. A sua generosidade ímpar (quase extinta neste mundo) e sua amizade acima de tudo. És muito especial;

Agradeço ao **LRC e a todos os integrantes e ex-integrantes deste**, certamente cada um me ensinou e/ou me ajudou nessa minha longa jornada de LRC (2007-2014, mas isso não é uma despedida, estarei presente pós-Tese), meu obrigada a todos vocês: Marcos Eleutério, Weriton Ferreira, Polyana Barros, Lucas Fonseca, Fábio Oliveira, Glaucevane Guedes, Annelise Paiva, Glauber Schettino, Sheila (a 1^a técnica), Cheila Gomes, Gabriele Teles, Flávio Moura, Halina Araújo, Luíza Fernandes, Sócrates Afonso, Cleópatra Selene, Mariana Alencar, Stella Vasconcelos, José Leitão, Alexandre Omena, Paloma Bento, Camila Vasconcelos, Carlos Almeida Dias, Maria Marta Farias, Lydiane Lobo, Lúcia Furtado, Natalli Morais, Lorena Macêdo, Vanessa Késsia, Layanne Cabral, Jeomacio Silva (o 2º técnico), Regiane Sabatine, Anita Gomes, Reidson Beiriz, Carlos Alberto Silva-Jr,

Rosiane Freire, Carlos Eduardo, Nelson Miguel, Fernanda Oliveira, Silmara Almeida, Luciana Melo, Tamires Nascimento, Jocyellen Casado, Andrei Loureiro. Ufa! Não foram poucos, afinal, foram 7 anos de LRC...destes tantos algumas amizades durarão, certamente. Especial destaque a Glaucevane Guedes, por todo suporte burocrático e outros durante todo este período no LRC, certamente você “quebrou muitos galhos”;

A todos os meus **amigos** que, de alguma forma, contribuíram em meu crescimento, seja ele científico ou não;

A todos os **integrantes do Laboratório AG Bader** (MDC-Alemanha) que estiveram presentes durante o doutorado sanduíche na Alemanha. Especialmente a minha amiga **Íris Apostel-Krause** (Secretária AG Bader) que, além dos serviços profissionais, com muito carinho me ajudou com as correções do meu inglês escrito, me apresentou a língua Alemã na tentativa que um dia eu falasse fluentemente, e por toda a ajuda pessoal fora do laboratório;

À Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia (**RENORBIO**) e todos os professores e Coordenadores pela participação na minha formação acadêmica, em especial aos **Professores Dr. Euzébio Goulart Sant'Ana e Dra. Marília Goulart** pela importância ímpar no Ponto Focal Alagoas e pelo competente trabalho da Secretaria do Programa, **Ana Paula O. da Silva**;

Aos **colegas de turma** pelos momentos bons de aprendizado que passamos juntos;

À **Universidade Federal de Alagoas** pelo acolhimento desde a graduação, aos funcionários do ICBS, da Biblioteca; em especial as Bibliotecárias; da Reitoria e dos demais setores administrativos;

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de doutorado no Brasil e ao “Deutscher Akademischer Austausch Dienst” _ “German Academic Exchange Service”_ (**DAAD**)/

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela bolsa de doutorado sanduíche na Alemanha;

À **Banca de qualificação** composta pelos Profs. Dr. Daniel Góis Gitaí, Dra. Marilia Oliveira Fonseca Goulart, Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira e Dra. Glaucevane da Silva Guedes pela contribuição, sugestões e correções da Tese;

À **Banca de defesa** composta pelos Profs. Prof. Dr. Michael Bader, Dra. Natalia Alenina, Profa. Dra. Gloria Isolina Boente Pinto Duarte, Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, Prof. Dr. Alessandro Riffel pelas contribuições, sugestões e correções da Tese;

Aos **animais experimentais** todo meu respeito e agradecimento pelo sacrifício da vida em prol da ciência;

Ao meu maior Mestre: **Deus**. Pelo cuidado e força para seguir em frente proporcionada a cada amanhecer...pelo amparo e proteção nos momentos mais difíceis dessa longa jornada. Certamente, **ELE** é meu maior colaborador e amigo;

À minha **Família**: meu pai **Givanildo Rodrigues** (*in memoriam*), minha mãe **Fátima Nunes** e irmãos **Carlos Eduardo** e **Franciolly Henrique**, meus tesouros. Como queria que estivesse comigo meu pai, celebrando juntos mais uma etapa quase finalizada, a saudade é enorme, mas tenho certeza que de onde estiver estarás olhando por nós e sempre conosco. Obrigada por entenderem minha escolha profissional, minhas inúmeras ausências devido às viagens, escrita e estudo para finalização deste trabalho. Obrigada pela base familiar que me proporcionaram. Sou eternamente grata a todo apoio em tudo que fiz até o momento, a todo suporte financeiro e emocional e, acima de tudo, pelo exemplo de vida que são e amor incondicional. Eu Amo vocês!

Perdoe-me se esqueci de alguém, mas agradeço de coração a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta e deixo todo o meu respeito e carinho aqui expressos.

Valéria Nunes

E no silêncio sempre escuto o que importa...

*Ainda que eu falasse
A língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria*

*É só o amor! É só o amor
Que conhece o que é verdade
O amor é bom, não quer o mal
Não sente inveja ou se envaidece*

*O amor é o fogo que arde sem se ver
É ferida que dói e não se sente
É um contentamento descontente
É dor que desatina sem doer*

*Ainda que eu falasse
A língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria*

*É um não querer mais que bem querer
É solitário andar por entre a gente
É um não contentar-se de contente
É cuidar que se ganha em se perder*

*É um estar-se preso por vontade
É servir a quem vence, o vencedor
É um ter com quem nos mata a lealdade
Tão contrário a si é o mesmo amor*

*Estou acordado e todos dormem
Todos dormem, todos dormem
Agora vejo em parte
Mas então veremos face a face*

*É só o amor! É só o amor
Que conhece o que é verdade*

*Ainda que eu falasse
A língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria*

(Monte Castelo - Legião Urbana)

RESUMO

A suscetibilidade genética individual, a alimentação inadequada e o sedentarismo figuram entre os mais relevantes fatores de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas. Neste contexto, os dois eixos do sistema renina angiotensina (SRA), Enzima Conversora de Angiotensina–Angiotensinall–receptor AT1 e Enzima Conversora de Angiotensina 2–Angiotensina-(1–7)–receptor Mas, participam de mecanismos reguladores homeostáticos centrais. A Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) atua na tentativa de contrabalancear as ações mediadas, principalmente, pela Angiotensina II. Neste cenário, a ação relevante da ECA2 na regulação cardiovascular já foi sugerida, mas a participação desta enzima na homeostase glicêmica e lipídica ainda permanece controversa. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar as alterações metabólicas lipídicas e glicêmicas decorrentes da deleção gênica da ECA2 em camundongos C57BL/6 e *knockout* para a apolipoproteína E (*ApoE*^{-/-}) bem como os principais mecanismos envolvidos. Camundongos C57Bl/6 e ECA2^{-/-} foram analisados nas idades de 3, 6 e 12 meses após consumo de dieta padrão (Kcal, 10% lipídios) e nas idades de 6 e 12 meses após consumo de dieta hiperlipídica (Kcal, 45% lipídios). Animais ApoE/ECA2^{-/-} com 6 meses de idade também foram utilizados no estudo. A deleção gênica da ECA2 causou um efeito metabólico paradoxal: em todas as idades analisadas os animais ECA2 *knockouts* apresentaram uma acentuada diminuição do peso corporal, da deposição de tecido adiposo branco e do perfil lipídico sistêmico. Este evento está associado a menor susceptibilidade a obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura nos animais com 6 meses, mas não com 12 meses de idade. Entretanto, esta deleção gênica induziu tanto a esteatose como ao prejuízo na sinalização insulínica hepática. O provável mecanismo envolve o aumento da expressão gênica de CD36 e a diminuição proteica da sirtuina 1 e proteína quinase A no fígado, associado a elevada expressão do UCP2, uma proteína desacopladora mitocondrial cuja principal função é o controle da produção de oxidantes. Além disso, diferente dos resultados hepáticos, sistematicamente, os animais ECA2^{-/-} são mais tolerantes à glicose e sensíveis à insulina. Esses resultados são decorrentes da menor deposição de gordura nestes animais, associado ao aumento da expressão de genes envolvidos na regulação insulínica no tecido adiposo branco e no músculo. Semelhante aos ECA2^{-/-}, a dupla deleção gênica (*ApoE/ECA2*^{-/-}) atenuou o perfil metabólico dislipidêmico dos animais *ApoE*^{-/-}, resultando-se em um fenótipo sistêmico semelhante aos animais ECA2^{-/-}, a citar: diminuição do peso corporal, dos níveis de triglicerídeos e dos ácidos graxos livres no plasma, somando-se a esteatose hepática causada por mecanismos dependentes de aumento da via CD36 e diminuição da via da sirtuina 1 hepática. Os novos achados indicam que a ECA2 e/ou o “novo eixo” do SRA tem um papel central na regulação do metabolismo glicêmico e lipídico tanto sistêmico quanto hepático e, provavelmente, por um mecanismo dependente de idade. A deleção da ECA2 em camundongos envolve a proteção contra obesidade, mas não esteatose, induzida por dieta hiperlipídica. Neste sentido, ECA2^{-/-} é um novo modelo animal de lipodistrofia e representa uma ferramenta de investigação para novos tratamentos metabólicos.

Palavras-chave: ECA2 *knockout*, sistema renina angiotensina, esteatose, lipodistrofia, obesidade.

ABSTRACT

Individual genetic susceptibility, inadequate nutrition and sedentary lifestyle figure among the most relevant risk factors for the emergence of cardiovascular and metabolic diseases. In this context, the two axes of the renin-angiotensin system (RAS), Angiotensin Converting Enzyme–Angiotensin II–AT1 receptor and Angiotensin Converting Enzyme 2–Angiotensin-(1-7)–Mas receptor, participate in central homeostatic regulatory mechanisms. Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) acts in an attempt to counteract the actions mediated, mainly, by Angiotensin II. In this scenario, the relevant action of ACE2 in the cardiovascular regulation has already been suggested, but the participation of such enzyme in glucose and lipid homeostasis still remains controversial. Thus, the aim of this work was to characterize the lipid and glucose metabolic alterations resulting from the gene deletion of ACE2 in C57BL/6 and apolipoprotein E knockout ($\text{ApoE}^{-/-}$) mice, as well as the main mechanisms involved. C57Bl/6 and $\text{ACE2}^{-/-}$ mice were assessed at 3, 6 and 12 months of age after consumption of standard diet (Kcal, 10% lipids) and at 6 and 12 months of age after consumption of high fat diet (Kcal, 45% lipids). $\text{ApoE}/\text{ACE2}^{-/-}$ mice at 6 months of age were also used in the study. The gene deletion of ACE2 caused a paradoxical metabolic effect: at all ages assessed, ACE2 knockout animals presented a marked reduction in body weight, white adipose tissue deposition and systemic lipid profile. This event is associated with a lower susceptibility to high fat diet-induced obesity in animals at 6 months of age, but not at 12 months of age. Nevertheless, such gene deletion induced both steatosis and impairment in insulin signaling in the liver. The probable mechanism involves the increase of CD36 gene expression and the protein decrease of sirtuin 1 and protein kinase A in the liver, coupled with high expression of UCP2, a mitochondrial uncoupling protein which main function is control the production of oxidants. Furthermore, different from the results in the liver, systemically, $\text{ACE2}^{-/-}$ animals present greater glucose tolerance and greater insulin sensitivity. These results are due to lower fat deposition in these animals, coupled with increased expression of genes involved in insulin regulation in the white adipose tissue and in the muscle. Similar to the $\text{ACE2}^{-/-}$ animals, the double gene deletion ($\text{ApoE}/\text{ACE2}^{-/-}$) attenuated the dyslipidemic metabolic profile of $\text{ApoE}^{-/-}$ animals, resulting in a systemic phenotype similar to that observed in $\text{ACE2}^{-/-}$, for example: reduction in body weight, triglyceride levels and free fatty acids in plasma, along with the hepatic steatosis caused by mechanisms dependent on the increase in the CD36 pathway and reduction in the hepatic sirtuin 1 pathway. The new findings indicate that ACE2 and/or the “new axis” of the RAS have a central role in the regulation of glucose and lipid metabolism both systemically and in the liver, and probably, by an age-dependent mechanism. ACE2 deletion in mice involves the protection against high fat diet-induced obesity, but not steatosis. In this sense, $\text{ACE2}^{-/-}$ is a new animal model of lipodystrophy and represents a tool for investigating new metabolic treatments.

Keywords: ACE2 knockout, renin-angiotensin system, steatosis, lipodystrophy, obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Sistema renina angiotensina.....	25
Figura 2 -	Domínios da ECA2 e sua homologia com a ECA1 e colectrina.....	27
Figura 3 -	Distribuição da ECA2 na membrana celular e órgãos..	28
Figura 4 -	Esquema simplificado da hipótese dos dois “hits ”	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos transgênicos do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas... 43

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ang I – Angiotensina I
Ang II – Angiotensina II
Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)
ApoE^{-/-} - Apolipoproteína E
AT1 – receptor da angiotensina II do tipo 1
COL – Colesterol
DHGNA - Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas
ECA1 – Enzima conversora de angiotensina
ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
EROs - espécies reativas de oxigênio
ERONs - espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
GMPc - Guanilato ciclase solúvel
HDLs - Lipoproteína de alta densidade
IDLs - Lipoproteína de densidade intermediária
Mas R- Receptor Mas
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1
MMP9 – Matrix metalopeptidase 9
•NO - óxido nítrico
•O₂⁻ - ânion superóxido
PPAR γ – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama
RI – resistência à insulina
RT - região transmembranar
SMet – Síndrome metabólica
SRA – Sistema renina angiotensina
VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa
TAB - tecido adiposo branco
TG – Triglicerídeo
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UCP2 – Proteína desacopladora 2
VCAM-1 – Molécula de adesão da célula vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA GERAL.....	24
3.1	O sistema renina angiotensina (SRA).....	24
3.1.1	Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2).....	26
3.2	Relevância do SRA nas doenças cardiovasculares e metabólicas.....	29
3.2.1	Disfunções cardiovasculares.....	29
3.2.2	Aterosclerose.....	30
3.2.3	Síndrome metabólica e as desordens associadas.....	32
3.2.4	Participação do eixo ECA2–Ang-(1–7)–Mas nas Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA).....	36
3.2.4.1	Avaliação das DHGNA e marcadores oxidativos: possível papel do UCP2.....	38
3.3	Modelos animais com alterações genéticas para o eixo ECA2/Ang-(1–7) Mas	40
	REFERÊNCIAS.....	45
4	CAPÍTULO 1 - Artigos derivado da tese.....	62
4.1	Artigo derivado da Tese “ACE2-null mice are protected from high-fat diet-induced obesity”	63
4.2	Artigo derivado da Tese “Genetic deletion of ACE2 induces hepatic steatosis in mice”.....	93
5	CAPÍTULO 2 – Avaliações metabólicas em camundongos com deleção gênica dupla para Apolipoproteína E e a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ApoE-ECA2-/-y).....	122
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
	ANEXOS.....	143
	Anexo 1 - Prêmio - Apresentação oral em congresso.....	144
	Anexo 2 - Participação em artigo: “Genetic deletion of ACE2 induces endothelial dysfunction in C57Bl/6 mice via oxidative/nitrosative stress”.....	150

Anexo 3 - Artigo decorrente do estágio didático em Fisiologia I e II: “A student-centered approach for developing active learning: the construction of physical models as a teaching tool in medical physiology”.....	152
Anexo 4 - Participação em patente depositada: Composição alimentícia nutracêutica contendo cereais integrais e resíduo sólido de carapaça de caranguejo.....	154

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, as doenças metabólicas e cardiovasculares configuram-se como um dos principais problemas de saúde pública em praticamente todo o mundo (ALBERTI et al., 2009; CAMERON et al., 2009; PALETAS et al., 2010; SIMMONS et al., 2010). Nestes, as mudanças no estilo de vida são mais acentuadas. Assim, somando-se a suscetibilidade genética individual, a alimentação inadequada e a inatividade física figuram entre os mais relevantes fatores de risco para o surgimento de tais doenças, a citar a hipertensão arterial (MATHIEU et al., 2009), o diabetes *mellitus* tipo II (MAHMOOD, ABED, MERKHAN, 2013; MOLNAR et al., 2005), a aterosclerose (ERDELY, KEPKA-LENHART, SALMEN-MUNIZ et al., 2010), a obesidade, as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA), e a síndrome metabólica (SMet) (ALBERTI et al., 2009; CAMERON et al., 2009; SIMMONS et al., 2010).

A SMet configura-se como uma das doenças mais complexas, dentre as citadas anteriormente, uma vez que reúne diversas outras, como a hipertensão arterial, o diabetes *mellitus* tipo II e a dislipidemia (IDF, 2013) e, desta forma, constitui um desafio multidisciplinar na prática clínica. Recentemente, as DHGNA foram descritas como um novo componente da SMet (ALBERTI et al., 2009). Estas doenças hepáticas são agravos crônicos, decorrentes da infiltração de gordura no fígado na ausência de consumo em longo prazo de etanol e/ou outras causas conhecidas de doença hepática (HASHIMOTO, TOKUSHIGE, LUDWIG, 2014). Estas podem progredir para esteatohepatite não alcoólica, caracterizada por esteatose, inflamação e fibrose, em último estágio podendo evoluir para cirrose e hepatocarcinoma (GENTILE, PAGLIASSOTTI, 2008; QURESHI, ABRAMS, 2007).

Estima-se que a DHGNA, uma doença do fígado comum nos Estados Unidos, mas com prevalência aumentada em todo mundo, afeta em torno de 25-30% da população geral, 10% de crianças e até 80% de indivíduos obesos e diabéticos (GENTILE, PAGLIASSOTTI, 2008; WIECKOWSKA, MCCULLOUGH, FELDSTEIN, 2007). No Brasil, Cotrim e colaboradores (COTRIM et al., 2011) observaram que as DHGNA são mais frequentes em homens assintomáticos, onde, predominantemente, o diagnóstico histológico encontrado foi de esteatohepatite com quadro fibrótico, somando-se estes a um número significativo de casos com cirrose.

Alterações e/ou ativação de determinadas vias podem levar ao aparecimento das complicações que caracterizam a SMet, figurando entre as principais, tem-se a via do sistema renina angiotensina (SRA), um dos maiores mecanismos reguladores da homeostase cardiovascular e metabólica (BADER, 2010; RABELO, ALENINA, BADER, 2011; SANTOS et al., 2008).

O SRA, composto por dois eixos, o “clássico”, ECA–AngII–AT1, e o “novo eixo”, ECA2–Ang-(1–7)–Mas receptor, está envolvido não apenas na regulação da função cardíaca (CRACKOWER et al., 2002; SANTOS et al., 2003), mas em outros agravos tanto vasculares (RABELO et al., 2008; XU et al., 2008) como metabólicos (NABESHIMA et al., 2009; SANTOS et al., 2008). Estudos mostram que esse sistema também participa da atenuação da SMet (MAHMOOD, ABED, MERKHAN, 2013), do desenvolvimento de placas ateroscleróticas (JACOBY, RADER, 2003; LOVREN et al., 2008), da disfunção endotelial e do estresse oxidativo (RABELO et al., 2008; XU et al., 2008), da resistência à insulina, do diabetes tipo II (SANTOS et al., 2008), de diversos processos inflamatórios e da esteatose hepática (FELTENBERGER et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Neste cenário, no “clássico” eixo do sistema, a angiotensina II (Ang II), um peptídeo bioativo com ação vasoconstritora, formado pela hidrólise da angiotensina I (Ang I), pela enzima conversora de angiotensina (ECA), aparece como o principal mediador, devido aos seus efeitos pró-aterosclerótico e vasoconstritor, sinalização mediada após ligação ao receptor AT1 (BADER, 2010).

Por outro lado, no “novo eixo”, a ECA2 catalisa a conversão da Ang I em angiotensina-(1-9) e da Ang II em angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). Esta última, por sua vez, possui diversas ações de proteção cardiovascular, como a liberação de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) (SAMPAIO et al., 2007; XU et al., 2008), após ligação ao receptor Mas acoplado à proteína G na membrana celular (SANTOS et al., 2003).

Diversos estudos metabólicos demonstram a relevância do eixo ECA2–Ang-(1–7)–Mas para a homeostase (FELTENBERGER et al., 2013; MAHMOOD, ABED, MERKHAN, 2013; PATEL et al., 2012; SAHARA et al., 2013; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2013). Além da importante participação na função cardiovascular (CRACKOWER et al., 2002), a ECA2 foi descrita como um regulador de transporte de aminoácidos (HASHIMOTO et al., 2012; SINGER et al., 2012), inibidor de fibrose no fígado (OSTERREICHER et al., 2009), protetor contra o desenvolvimento de

retinopatia diabética (VERMA et al., 2012) e insuficiência pulmonar aguda (IMAI et al., 2005). Entretanto, o papel preciso desta glicoproteína no metabolismo lipídico ainda não foi explorado.

Considerando toda a via bioquímica, dos eixos do sistema acima descrito, evidencia-se que a ECA2 atua intentando contrabalancear o SRA, tanto por regular negativamente os níveis de Ang II quanto positivamente os níveis de Ang-(1-7), protegendo, desta forma, contra danos cardiovasculares advindos das ações da Ang II na vasculatura via receptor do tipo 1 (AT1) (DONOGHUE et al., 2000; SANTOS et al., 2003).

A ECA2 exerce função de proteção cardiovascular via redução do estresse oxidativo, uma vez que a produção de $\cdot\text{NO}$ é induzida pela Ang-(1-7) (RABELO et al., 2011; ZHANG et al., 2010). Além disso, a ECA2 protege as células endoteliais da infiltração de macrófago e do estresse oxidativo, mediado pela Ang II, de forma dependente de Ang-(1-7) (GUO et al., 2008; TESANOVIC et al., 2010).

Somando-se as ações acima citadas para esta enzima, Lovren e colaboradores (2008) mostraram que a ECA2 diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e atenua a aterosclerose em animais com deleção gênica para a apolipoproteína E ($\text{ApoE}^{-/-}$). Além disso, estudo relata que o tratamento em longo prazo de camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ com Ang-(1-7) induz efeitos ateroprotetores pela melhora da função endotelial, resultante da maior biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$ e diminuição da produção de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (TESANOVIC et al., 2010).

O papel preciso da ECA2 no metabolismo glicêmico ainda é controverso (NIU et al., 2008; TAKEDA et al., 2013). Além disso, a caracterização das vias envolvendo esta enzima no metabolismo lipídico ainda não foi executada. Nesse sentido, estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a ECA2 pode atuar nos sistemas supracitados. No cenário apresentado, a avaliação dos efeitos da deleção gênica da ECA2 tanto em um modelo animal sem intervenção ambiental (deleção gênica da ECA2 no *background* C57BL/6) quanto em modelos com agravos induzidos por diferentes vias ($\text{ECA2}^{-/-}$ + dieta hiperlipídica e $\text{ECA2}^{-/-}$ + $\text{ApoE}^{-/-}$ – dislipidemia induzida por um fator ambiental e por um fator genético, respectivamente), será abordada neste trabalho. Ademais, será avaliada a influência da ECA2 na idade avançada como outra via indutora de distúrbios metabólicos.

Com base nas premissas elencadas, hipotetiza-se que a ECA2 possa atuar no metabolismo glicêmico e lipídico e que tanto os animais ECA2^{-/-} quanto os animais duplo *knockout* (ApoE e ECA2) podem ser uma ferramenta importante para o estudo de possíveis vias comuns entre a aterosclerose, a dislipidemia e o SRA. Além disso, esses modelos animais serão úteis na avaliação de marcadores bioquímicos que caracterizem desarranjos metabólicos e vasculares, bem como o estudo da influência de fatores ambientais nas desordens cardiometabólicas, tais como o consumo de dieta rica em gordura.

Nesse sentido, a partir dos achados deste estudo, acredita-se que o camundongo ECA2^{-/-} servirá como um modelo animal para avaliação de agravos associados a esta deleção. Desta forma, intenta-se contribuir de forma direta tanto para o entendimento do processo patológico associado ao SRA como para a identificação futura de novos alvos terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar as alterações nas principais vias metabólicas lipídicas e glicêmicas decorrentes da deleção gênica da ECA2 em camundongos, bem como os principais mecanismos envolvidos.

2.2 Específicos

- Avaliar em camundongos C57BL/6, ECA2^{-/-} e ApoE^{-/-}, os principais parâmetros cardiometabólicos, a saber: peso corporal, index de adiposidade, tamanho do adipócito, glicemia de jejum, tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, gliconeogênese, lipólise, níveis de insulina, adiponectina, leptina, ingestão líquida e alimentar, gasto energético, composição corporal, e perfil lipídico plasmático, fecal e hepático pela dosagem de colesterol total (COL), triglicerídeos (TG) e ácidos graxos livres;
- Estudar a função, morfologia e a deposição lipídica hepática nos animais supracitados;
- Em camundongos ECA2^{-/-}, estudar os efeitos acima citados após o consumo de dieta padrão “chow” e hiperlipídica por 22 semanas;
- Mensurar o estresse oxidativo hepático através da avaliação gênica e proteica do marcador UCP2 e a peroxidação lipídica;
- Avaliar a influência da idade no metabolismo dos animais ECA2^{-/-} em três diferentes faixas etárias (3, 6 e 12 meses);
- Investigar a expressão de genes alvo para o metabolismo lipídico e glicídico em animais ECA2^{-/-} nos principais órgãos metabólicos: tecido adiposo branco, fígado e músculo esquelético;

- Mensurar a expressão hepática de proteínas relacionadas ao metabolismo glicêmico e lipídico;
- Analisar o papel da ECA2 em um modelo dislipidêmico através do desenvolvimento e avaliação de um camundongo duplo *knockout* para a ApoE e a ECA2.

3 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

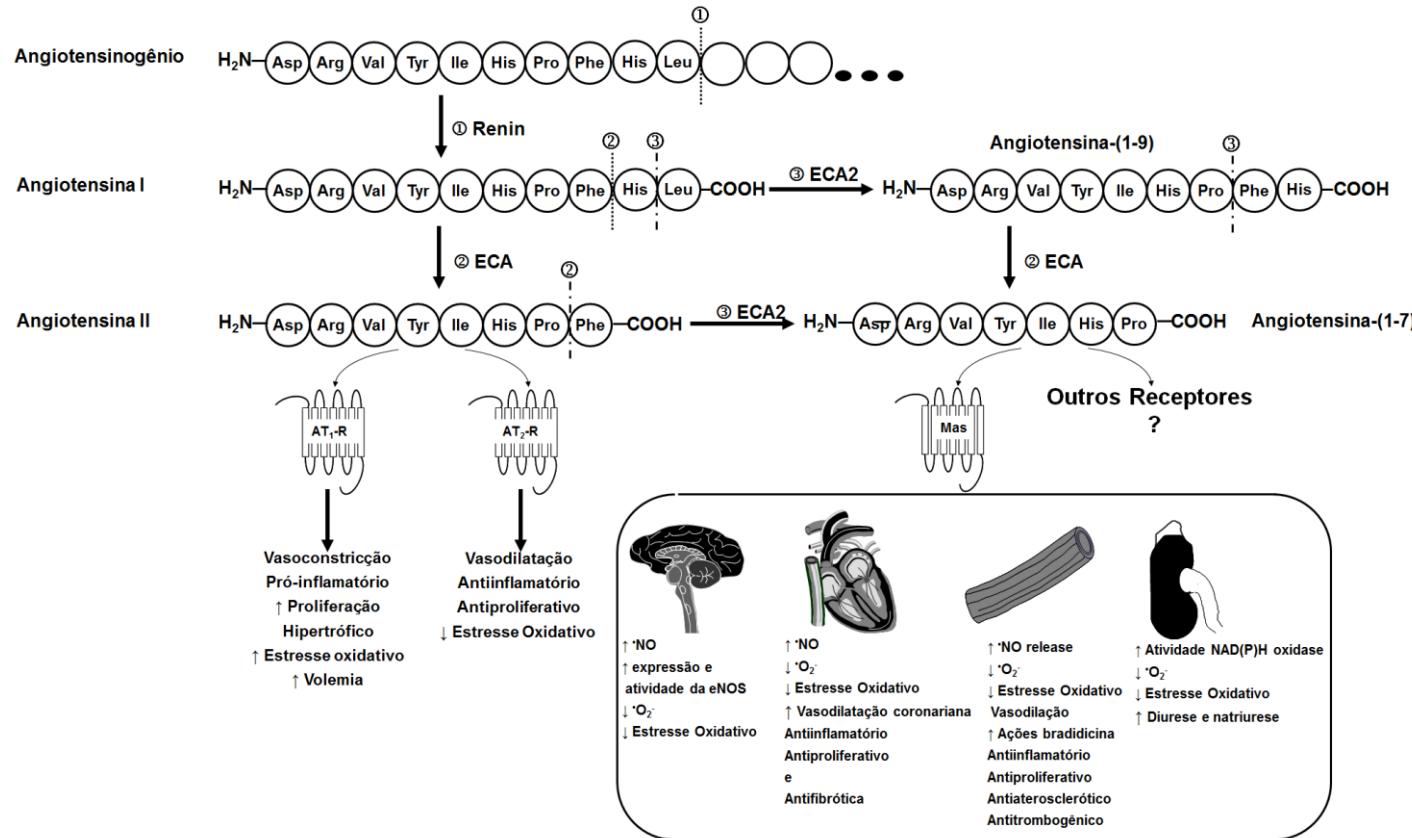
3.1 O Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O SRA é um importante regulador da homeostase corporal (BADER, 2010). Uma vez que esta via produz diferentes hormônios diretamente envolvido no controle desta, especial destaque é dado na regulação cardiovascular, à regulação deste sistema pode ser complexa. Atualmente, o SRA é descrito em sua constituição por dois eixos, o “clássico” e o “novo”, os quais possuem ações, predominantemente, antagônicas e o desequilíbrio nestes pode resultar no aparecimento de diversas doenças cardiometabólicas (RABELO et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

A ECA1, Ang II e receptor AT1 são os mais bem caracterizados deste sistema e correspondem ao conhecido “eixo clássico” (JAYASOORIYA et al., 2008; NABESHIMA et al., 2009; YANG et al., 2011). As ações dessa via iniciam-se pela enzima renina, a qual é produzida nos rins e atua na clivagem do angiotensinogênio, a partir do qual é produzido a Angiotensina I (Ang I) liberada no plasma. Esta, por sua vez, sofre a ação da ECA1, sendo metabolizada, principalmente, nos pulmões e nas células endoteliais em Angiotensina II (Ang II), o peptídeo bioativo de ação vasoconstritora majoritária do SRA. Este exerce seu efeito em diferentes órgãos, principalmente após a ligação ao receptor AT1 (BADER, 2010).

O “novo eixo” do SRA, atualmente reconhecido como o braço protetor deste sistema, é caracterizado pela via ECA2–Ang-(1-7)–Mas receptor (KUBA, IMAI, PENNINGER, 2013; SANTOS et al., 2013). A ECA2 é um homólogo da ECA1 e hidrolisa Ang I e Ang II em Ang-(1-9) e Ang-(1-7), respectivamente (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). A Ang-(1-9) é clivada, via ação da ECA1, em Ang-(1-7), um importante heptapeptídeo cujo efeito é de vasodilatação, ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e geração de •NO (DA COSTA GONCALVES et al., 2007; NAKAMOTO et al., 1995; SAMPAIO et al., 2007) após interação com o receptor Mas acoplado a proteína G (SANTOS et al., 2003). Desta forma, o “novo eixo”, via atividade da ECA2, constitui um ponto chave do SRA por determinar os níveis locais do peptídeo vasoconstritor Ang II e do vasodilatador Ang-(1-7), consequentemente contrabalanceando as ações vasculares do eixo “clássico”. A Figura 1 representa, esquematicamente, os dois eixos do SRA.

Figura 1: Sistema renina angiotensina.



Os eixos “clássico” e “novo”, ECA1–AngII–AT1 e ECA2–Ang-(1–7)–Mas receptor, respectivamente. A enzima renina cliva o angiotensinogênio em angiotensina I (AngI) que, por sua vez, é hidrolizada pela enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1) no peptídio bioativo angiotensina II (Ang II), o qual interage com receptores para angiotensina do tipo I (AT1) e II (AT2). A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) catalisa a conversão de Ang I em angiotensina - (1–9) (Ang-(1–9)) e Ang II em angiotensina - (1–7) (Ang-(1–7)). Esta última, liga-se ao receptor Mas provocando numerosas ações de proteção cardiovascular. **Fonte:** Traduzido de Rabelo et al (2011).

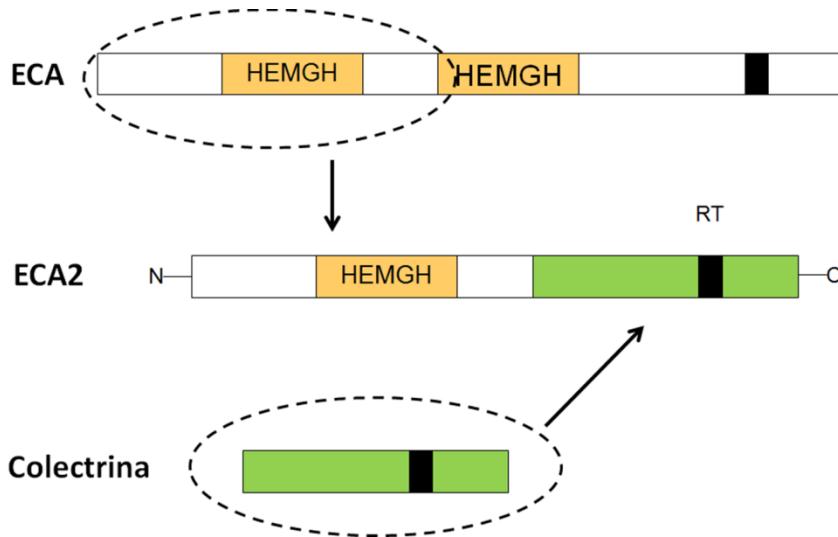
A história do “novo eixo” do SRA começou com a descoberta da Ang-(1-7) por estudos de Santos e colaboradores (SANTOS et al., 1988). Os autores demonstraram que o homogenato de tronco cerebral de cachorro incubado com Ang I e inibidor da ECA1 produziu o heptapeptídeo que eles chamaram de Ang-(1-7) (SANTOS et al., 1988). No mesmo ano, este grupo de pesquisadores demonstrou que a Ang-(1-7) libera vasopressina no hipotálamo de ratos (SCHIAVONE et al., 1988).

Em 2003, o receptor Mas foi incluído como um dos principais componentes deste eixo, ECA2-Ang-(1-7)-Mas (SANTOS et al., 2003). Neste trabalho, o uso dos animais *Mas*^{-/-}, foi um marco para identificação da ação da Ang-(1-7) através da ligação ao receptor Mas acoplado à proteína G. Na sequência, realizaram-se muitas investigações para desvendar o fenótipo destes animais (BOTELHO-SANTOS et al., 2012; DA COSTA GONCALVES et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; RABELO et al., 2008; SANTOS et al., 2006; SANTOS et al., 2008; XU et al., 2008).

3.1.1 Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)

A ECA 2, enzima descoberta em 2000 (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000), é uma glicoproteína com dois domínios funcionais. Um deles, o N-terminal, apresenta em torno de 41% da sequência idêntica a ECA1 e funciona como carboxipeptidase (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). O outro domínio, o C-terminal, é 48% idêntico a colectrina (ZHANG et al., 2001), uma proteína que tem um importante papel durante o transporte de aminoácidos nos rins (DANILCZYK et al., 2006) (Figura 2).

Figura 2 Domínios da ECA2 e sua homologia com a ECA e colectrina.



A ECA2 possui dois domínios, o domínio extracelular catalítico aninoterminal, o qual apresenta homologia com a ECA e um sítio ativo (HEMGH), e o domínio carboxiterminal, o qual apresenta homologia com a colectrina e possui a região transmembranar (RT) da enzima. **Fonte:** Adaptado de Kuba et al. (KUBA et al., 2013).

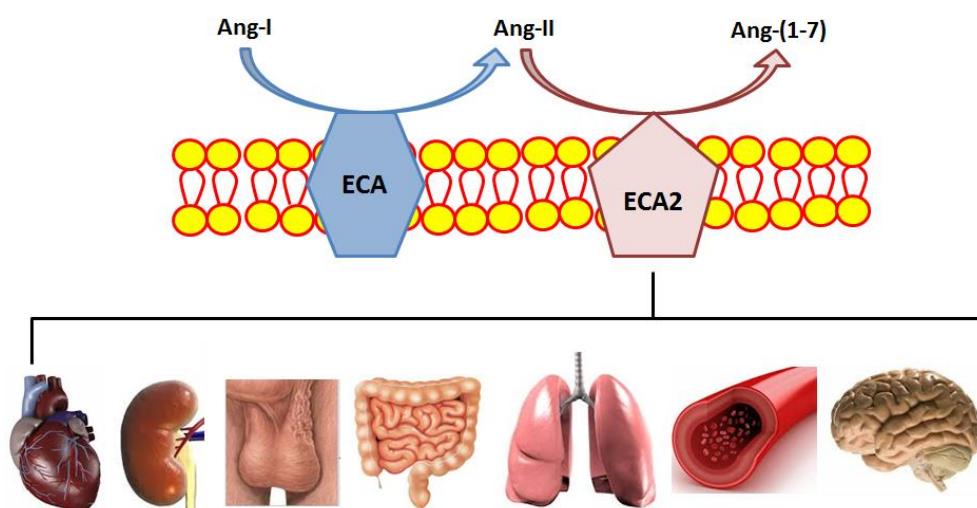
Recentemente, Singer e colaboradores (SINGER et al., 2012) demonstraram que camundongos $ECA2^{-/-}$ apresentam defeito na absorção de aminoácidos intestinais e Hashimoto e colaboradores (HASHIMOTO et al., 2012) identificaram a ECA2 como um importante regulador da homeostase dos aminoácidos dietéticos, caracterizando-se, desta forma, uma relação molecular entre o SRA e o transporte de aminoácidos intestinal.

No SRA, a ECA2 funciona como uma peptidase (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000) e, devido a esta função, esta enzima é considerada um regulador negativo deste sistema por diminuir os níveis de Ang II, uma molécula com ação vasoconstritora e pró-oxidativa, e por aumentar os níveis de Ang-(1-7), uma molécula com ação vasodilatadora e antioxidante, o que confere a ECA2 um papel protetor nas doenças cardiovasculares (CRACKOWER et al., 2002; RABELO et al., 2011; SATO et al., 2013; ZHONG et al., 2010).

A ECA2, assim como a ECA1, é uma enzima associada à membrana e expressa predominantemente no endotélio (HAMMING et al., 2004) (Figura 3). Contudo, a atividade daquela não é inibida pelos inibidores clássicos da ECA1 (exemplos: captopril, lisinopril, enalapril). Ademais, ela é restrita a alguns órgãos

como o coração, rins, testículos (DONOGHUE et al., 2000; GEMBARDT et al., 2005; TIPNIS et al., 2000) intestino, pulmões (GEMBARDT et al., 2005; HAMMING et al., 2004; XIE et al., 2006), vasos sanguíneos (HAMMING et al., 2004) e cérebro (GEMBARDT et al., 2005; HAMMING et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3 Distribuição da ECA2 na membrana celular e órgãos.



A ECA2 é uma enzima associada à membrana celular (assim como a ECA), é expressa predominantemente no endotélio e encontrada principalmente no coração, rins e testículos. Entretanto, a ECA2 também é encontrada no intestino, pulmão, vasos e cérebro. **Fonte:** Esquema elaborado pela autora.

A ECA2, cujo gene está localizado no cromossomo X (TIPNIS et al., 2000), além de apresentar um importante papel na função cardiovascular, exerce também outras ações, o que a caracteriza como uma enzima multifuncional (KUBA et al., 2013). O prejuízo na expressão ou atividade da mesma leva, dentre outras, a desordens cardíacas (CRACKOWER et al., 2002; OUDIT et al., 2007), vasculares (PATEL et al., 2012; RENTZSCH et al., 2008) e renais (OUDIT et al., 2010; OUDIT, PENNINGER, 2011).

Esta enzima protege tanto contra o desenvolvimento de retinopatia diabética (VERMA et al., 2012) como para a severa insuficiência pulmonar aguda (IMAI et al., 2005). Lovren e colaboradores (2008) mostraram que esta enzima diminui a produção de EROs induzidas pela Ang II, protegendo o endotélio, além de atenuar a aterosclerose em animais ApoE^{-/-}. A ApoE caracteriza-se como uma apolipoproteína presente na superfície dos quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs), cuja função é ligar as

lipoproteínas aos seus respectivos receptores no fígado e em tecidos periféricos (FAZIO et al., 1997).

Corroborando com as informações supracitadas, recentemente, viu-se que a deleção da ECA2 promove o desenvolvimento da aterosclerose (SAHARA et al., 2013; THOMAS et al., 2010) e acentua a inflamação vascular e a aterosclerose em ApoE^{-/-} (THOMAS et al., 2010). Além disso, animais deficientes em ECA2 apresentam fibrose hepática grave em diferentes modelos de injúria hepática (OSTERREICHER et al., 2009).

Apesar das premissas relatadas anteriormente, a participação da ECA2 no metabolismo lipídico ainda permanece obscuro. Neste sentido, apesar da literatura demonstrar a importância de outros componentes do “novo eixo” do SRA no metabolismo lipídico, como por exemplo, a ausência do receptor Mas induzir a dislipidemia (SANTOS et al., 2008), outras investigações acerca dos mecanismos envolvidos são necessárias para melhor entendimento destas rotas. Ademais, a deleção conjunta do Mas e da ApoE (Mas-ApoE^{-/-}) tanto agrava a dislipidemia como induz a esteatose (SILVA et al., 2013).

Somando-se, recentemente, demonstrou-se que o tratamento com a Ang-(1-7) melhorou o metabolismo lipídico e previu tanto a esteatose como a inflamação hepática em animais que receberam dieta hiperlipídica (FELTENBERGER et al., 2013). Esses dados sugerem que o “novo eixo” do SRA, ECA2–Ang-(1-7)–Mas receptor, pode desempenhar um papel central na homeostase lipídica. Assim, postula-se que a ECA2 possa ser uma peça chave nos mecanismos acima elencados.

3.2 Relevância do SRA nas Doenças Cardiovasculares e Metabólicas

3.2.1 Disfunções cardiovasculares

O endotélio vascular é um componente central na manutenção da homeostase cardiovascular. Em condições fisiológicas, esta camada de célula é um sensor das mudanças hemodinâmicas e libera tanto fatores relaxantes, como o 'NO (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1987; PALMER, FERRIGE, MONCADA, 1987), quanto vasoconstritores, como o 'O₂' (RUBANYI, VANHOUTTE, 1986).

A liberação de 'NO representa um mecanismo chave na função endotelial por

mediar à interação entre o endotélio e as células do músculo liso (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007). Este mecanismo induz relaxamento pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GMPc) (IGNARRO, KADOWITZ, 1985; RAPOPORT, DRAZNIN, MURAD, 1983). O desequilíbrio na produção e/ou liberação de fatores endoteliais, leva ao aparecimento da disfunção endotelial, condição comum às doenças cardiovasculares (HIGASHI et al., 2002) e metabólicas (MOLNAR et al., 2005).

A relevância dos estudos envolvendo o SRA para o entendimento da disfunção cardíaca e endotelial, bem como do estresse oxidativo, este último caracterizado pela elevada produção e concentração de espécies reativas e/ou pela diminuição da capacidade antioxidante tecidual, agravos comuns nas doenças cardiovasculares, tem sido demonstrada em diferentes trabalhos (PEIRO et al., 2007; RABELO et al., 2008; RENTZSCH et al., 2008; XU et al., 2008).

Interessantemente, a vasodilatação aórtica acetilcolina-dependente está prejudicada em animais ECA2^{-/-} (LOVREN et al., 2008). Nesse sentido, o nosso grupo demonstrou que estes camundongos apresentam disfunção endotelial *in vivo*. Neste estudo, sugere-se que os mecanismos envolvem o estresse oxidativo tanto aórtico quanto sistêmico (RABELO et al., 2015; dados não publicados). Na linha desses achados, camundongos Mas^{-/-} exibem disfunção endotelial e elevada pressão sanguínea, prejuízos cardiovasculares que, por sua vez, diretamente se correlacionam com o estresse oxidativo (RABELO et al., 2008; XU et al., 2008), prejuízo na função endotelial em vasos isolados (PEIRO et al., 2007), diminuição do fluxo sanguíneo e aumento da resistência em diferentes leitos vasculares (BOTELHO-SANTOS et al., 2012).

Por outro lado, o aumento da expressão da ECA2 no músculo liso vascular de ratos hipertensos leva a melhora na função endotelial, a uma diminuição da vasoconstrição induzida pela Ang II, além de diminuição na pressão sanguínea. Eventos estes decorrentes, provavelmente, tanto da redução do estresse oxidativo como dos níveis de Ang II e aumento de Ang-(1-7) (RENTZSCH et al., 2008). Esses dados sugerem que o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas tem um importante papel na manutenção da função endotelial e controle do tônus vascular.

3.2.2 Aterosclerose

A aterosclerose é um processo crônico caracterizado por inflamação e fibrose

da parede de artérias de média e larga condutância (HOPKINS, 2013; LIBBY, 2012; LIBBY, LICHTMAN, HANSSON, 2013). Vários são os fatores de risco para esta doença, a citar a elevação do colesterol, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo e reações imunológicas (LIBBY et al., 2013; LUDEWIG, ZINKERNAGEL, HENGARTNER, 2002).

As complicações advindas da placa ateromatosa como inflamação, ulcerações e ruptura (HOPKINS, 2013; NAHRENDORF, MCCARTHY, LIBBY, 2012), levam ao aparecimento de outras como oclusões trombóticas e alteração na função endotelial (LIBBY et al., 2013; LIBBY, RIDKER, HANSSON, 2011; ROBBINS et al., 2013; SHIMOKAWA, 1999). Neste cenário, esta doença também é considerada o fator de risco mais relevante para o aparecimento das doenças cardiovasculares, bem como os principais mecanismos fisiopatológicos estão diretamente implicados com o SRA tanto em animais (SAHARA et al., 2013; TAKATA et al., 2013; THOMAS et al., 2010; WANG et al., 2013) como em humanos (ARKHIPOVA et al., 2013; LIBBY et al., 2013; LIBBY et al., 2011; QUILLARD, LIBBY, 2012; WITZTUM, STEINBERG, 2001).

Um estudo pioneiro relata que o tratamento, em longo prazo, de um modelo animal para a aterosclerose geneticamente modificado, o ApoE^{-/-}, com Ang-(1-7) induz efeitos ateroprotetores pela melhora da função endotelial, resultante da maior biodisponibilidade de •NO e diminuição da produção de •O₂⁻ (TESANOVIC et al., 2010).

O efeito protetor da ECA2 no desenvolvimento da aterosclerose também já foi descrito (LOVREN et al., 2008). A deleção da ECA2 em camundongos com aterosclerose (ApoE^{-/-}) acentua inflamação vascular e causa piora do quadro aterosclerótico pelo aumento do acúmulo de placa em toda a aorta e elevada expressão de mediadores aterogênicos, como citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (THOMAS et al., 2010). Ademais, Lovren e colaboradores (2008) mostraram que a ECA2 reduz a aterosclerose em animais ApoE^{-/-}.

Em camundongos com deleção genética para o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL-R^{-/-}) e alimentados com dieta “high-fat”, a deleção da ECA2 em células derivadas da medula óssea aumentou o desenvolvimento da aterosclerose através da regulação da Ang II/Ang-(1-7) (THATCHER et al., 2011). Neste sentido, Sahara e colaboradores (2013) descreveram que a deleção de ECA2 em ApoE^{-/-} causa lesão vascular, aumento da formação neoíntima arterial em

resposta a injúria endovascular na artéria femoral, bem como o aumento da expressão de genes relacionados à inflamação (VCAM-1, TNF- α , MCP-1, and MMP9).

Somando-se a ação de outros componentes do “novo eixo” na aterosclerose, a deleção conjunta do Mas e da ApoE (Mas-ApoE^{-/-}) induz ao agravamento do perfil dislipidêmico deste modelo animal, caracterizado pelo aumento de COL total e TG acompanhado da diminuição do HDL-colesterol sistemicamente (SILVA et al., 2013).

3.2.3 Síndrome metabólica e as desordens associadas

Diversas desordens metabólicas surgem em decorrência da ingestão alimentar inadequada, tanto em qualidade como em quantidade de calorias, bem como do crescente sedentarismo (ALBERTI et al., 2009; ECKEL et al., 2010; ELEUTERIO-SILVA et al., 2013) .

Dentre estes fatores, cita-se: obesidade corporal e/ou visceral (GASTALDELLI et al., 2002; MATHIEU et al., 2009), diabetes tipo II (MOLNAR et al., 2005; NG, 2013), hipertensão arterial sistêmica (MATHIEU et al., 2009), dislipidemia (ADIELS, TASKINEN, BOREN, 2008), resistência à insulina (RI) (AGUAYO, VELA, ANIEL-QUIROGA et al., 2013; NG, 2013) e as DHGNA (ALBERTI et al., 2009; ECKEL et al., 2010; FRAULOB et al., 2010).

No cenário exposto, a SMet, bem como os fatores a esta associados, configura-se, atualmente, como uma das principais doenças metabólicas estudadas, visto seu alto impacto na saúde da população e sua relação com as doenças cardiovasculares (ALBERTI et al., 2009; SIMMONS et al., 2010). Nesse contexto, estudos tanto em humanos (ELEUTERIO-SILVA et al., 2013; HU et al., 2004; MAHMOOD, ABED, MERKHAN, 2013) quanto em animais (FRAULOB et al., 2010; MOLNAR et al., 2005; SANTOS et al., 2008) foram e são largamente realizados para melhor entender os mecanismos fisiopatológicos que regem a SMet (FRAULOB et al., 2010; MOLNAR et al., 2005; SANTOS et al., 2008).

Considerando a complexidade destas desordens metabólicas, acredita-se ser importante a investigação dos mecanismos implicados tanto no controle da homeostase cardiovascular quanto do fluxo de glicose e lipídio corporal.

A dislipidemia é caracterizada por altos níveis de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue, como elevados níveis de TG, baixos níveis de HDL e/ou pelo aparecimento de LDLs pequenas e densas (ADIELS et al., 2008; FAZIO et al., 1997; NG, 2013).

A mudança no metabolismo de lipoproteínas é iniciada pela produção hepática excessiva de TG e VLDL (ADIELS, TASKINEN, BOREN, 2008; FAZIO et al., 1997; KAMAGATE et al., 2008). Esta última é liberada do fígado e pode ser convertida em IDL pela lipase lipoproteica presente no endotélio capilar dos vasos sanguíneos (LPL; “lipoprotein lipase”). A IDL, por sua vez, ainda nos vasos sanguíneos, pode ser convertida em LDL que é rica em COL e catabolizada, principalmente, através do reconhecimento hepático pelos seus receptores LDL específico (ADIELS et al., 2008).

A elevada concentração de glicose sanguínea, decorrente, principalmente, da incapacidade insulínica em exercer seus efeitos nos tecidos alvos, caracteriza o diabetes tipo II (COPELAND et al., 2013; REINEHR, 2013). A deficiência insulínica observada nesta doença produz alterações no metabolismo dos carboidratos e lipídios e, desta forma, associa-se à obesidade (ALBERTI et al., 2009), principalmente quando se faz uso de dietas com elevado teor calórico. Em conjunto, estes agravos são um grande problema mundial, principalmente em países desenvolvidos, onde os índices de prevalência destes são crescentes (ALBERTI et al., 2009; GASTALDELLI et al., 2002; SIMMONS et al., 2010).

Uma vez presente, o quadro de RI, a supressão da lipólise mediada por este hormônio estará prejudicada, ou seja, a degradação de lipídios será favorecida, bem como a contínua migração de ácidos graxos ao fígado, acarretando no aparecimento de RI hepática e consequente, hiperinsulinemia (ADIELS, TASKINEN, BOREN, 2008). Esta, por sua vez, estimula a lipogênese “de novo” hepática, elevando, desta forma, o acúmulo de triglicerídeos no fígado e a lipase hormônio sensível no tecido adiposo (BROWNING, HORTON, 2004). Este estímulo eleva ainda mais a liberação de ácidos graxos para a circulação mantendo, desta forma, um círculo vicioso de liberação e captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo e pelo fígado, respectivamente, caracterizando assim um mecanismo envolvido na patogenia das DHGNA pela diminuída ação da insulina (KOTRONEN, YKI-JARVINEN, 2008; MARCHEZINI et al., 2003). Além disso, o depósito de gordura visceral favorece a captação hepática de ácidos graxos, via circulação portal, pela sua favorável localização e esse acúmulo hepático de gordura, é também acentuado pela captura dos lipídios que chegam ao tecido a partir da alimentação, através dos quilomicrons (MATHIEU et al., 2009). Dessa forma, os ácidos graxos, principal reserva de calorias no organismo, são considerados importantes mediadores dos efeitos do tecido

adiposo como tecido endócrino complexo na SMet (CAPURSO, CAPURSO, 2012).

Além destes citados, outros fatores estão envolvidos na relação da obesidade visceral com o metabolismo lipídico do fígado alterado. Nesse sentido, a diminuição da secreção da adiponectina, uma importante citocina liberada pelo tecido adiposo, acarretada pelo aumento da produção de substâncias pró-inflamatórias como o TNF- α , pode contribuir para diminuir o metabolismo das lipoproteínas hepáticas, uma vez que esta participa de processos metabólicos em vários órgãos, incluindo o fígado (ZECHINI, PASQUAZZI, ACETI, 2004). Assim, esta desregulação no metabolismo lipídico do fígado e consequente desenvolvimento de esteatose hepática, dislipidemia e RI, pode representar papel chave na patogênese da DHGNA e agravos associados, como a SMet. Ademais, todos os componentes da SMet correlacionam-se com a concentração de gordura no fígado e a progressão desta aumenta com o grau de obesidade, fato que classifica as DHGNA como mais uma manifestação da SMet (ALBERTI et al., 2009; DEN BOER et al., 2004; PAGANO et al., 2002).

Estudo de Gastaldelli e colaboradores (2002) mostrou que, em pacientes diabéticos, o acúmulo de gordura visceral tem um impacto negativo no controle glicêmico, decorrente da diminuição da sensibilidade insulínica periférica e da acentuada gliconeogênese. Além disso, o desenvolvimento de enfermidades cardiovasculares, como a disfunção endotelial, estresse oxidativo, aterosclerose, entre outras, podem ser advindas do diabetes (BANDEIRA SDE et al., 2012; MOLNAR et al., 2005).

Nesse sentido, diversos estudos sugerem a participação do SRA nas desordens relacionadas à SMet (MARIO et al., 2012; SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2008). Camundongos *Mas*^{-/-} apresentam dislipidemia acompanhada pelo aumento de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, assim como dos níveis de leptina (SANTOS et al., 2008). Somando-se a estas alterações lipídicas, estes animais apresentam distúrbios no metabolismo glicêmico, caracterizada pela intolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina. Estes eventos são acompanhados da diminuição da expressão proteica do transportador para glicose, o GLUT4, no tecido adiposo branco (TAB). Ainda nesta direção, camundongos *Mas*^{-/-} apresentam diminuída resposta dos adipócitos à ação da insulina e isto foi associado com a diminuição da expressão do PPAR γ no TAB, importante regulador de lipogênese e captação de ácido graxo (GILARDI et al., 2014), sugerindo-se,

assim, a relevância do eixo ECA2–Ang-(1–7)–Mas também no metabolismo adipocitário (MARIO et al., 2012).

Nesta linha de raciocínio, outro estudo mostra que o aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7) melhora o perfil lipídico e glicídico, pela diminuição de COL, TG e da massa de gordura abdominal, acompanhado pelo aumento de adiponectina, assim como melhora na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (SANTOS et al., 2010).

Os trabalhos anteriormente citados se complementam, uma vez que indicam fortemente que a falta de um dos componentes do SRA, neste caso um receptor para a Ang-(1-7), o Mas, causa distúrbios metabólicos associados com a SMet (SANTOS et al., 2008). Os eventos metabólicos, provavelmente, envolvem a ausência dos efeitos da Ang-(1-7) após a ligação com o receptor, ao mesmo tempo que o outro estudo indica que o aumento da ação deste heptapeptídeo melhora o quadro de SMet (SANTOS et al., 2010).

Camundongos ECA2^{-/-} apresentam prejuízo na homeostase da glicose em diferentes idades (NIU et al., 2008). Contudo, isto ainda é controverso, uma vez que outro trabalho descreve que a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina estão normais em ECA2^{-/-} após consumo de dieta padrão para roedores, mas prejudicadas após ingestão de dieta com elevado teor de gordura e sacarose (TAKEDA et al., 2013). Além disso, as condições experimentais dos trabalhos citados são diferentes; no último, os testes metabólicos foram realizados com os animais anestesiados. Uma vez que esta estratégia experimental pode *per se* influenciar no metabolismo glicêmico (MUNIYAPPA et al., 2008), novas análises são necessárias para esclarecer o real papel da ECA2 neste sistema.

Com base nas premissas anteriormente elencadas e considerando-se que o fenótipo de disfunção cardíaca evidenciado no ECA2^{-/-} pode ser dependente de outros fatores durante a avaliação, como o uso de anestésico durante as medidas ecocardiográficas (GURLEY, COFFMAN, 2008), outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a ECA2 atua na homeostase glicêmica, lipídica e nos tecidos metabólicos envolvidos.

Neste sentido, corroborando com os trabalhos anteriormente citados, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, modelo animal amplamente utilizado para investigação da SMet, o tratamento oral com Ang-(1-7), diminui colesterol total, triglicerídeos e alanina aminotransferase plasmática, bem como

preveniu a deposição hepática de gordura (FELTENBERGER et al., 2013).

Em conjunto, esses dados sugerem que o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas do SRA pode apresentar um importante papel tanto regulador das alterações relacionadas à SMet como potencial terapêutica nesta desordem.

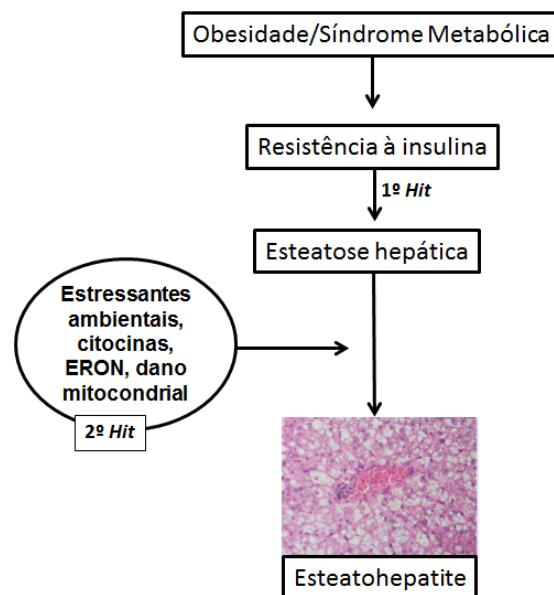
3.2.4 Participação do eixo ECA2–Ang-(1–7)–Mas nas doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA)

Somando-se aos agravos metabólicos anteriormente elencados, tem ganhado destaque as DHGNA (ALBERTI et al., 2009; FRAULOB et al., 2010). Sabendo-se da importância fisiológica hepática, o conhecimento das alterações patológicas, bem como os mecanismos envolvidos neste órgão, são de grande importância para a manutenção da qualidade de vida. Neste sentido, o fígado é um alvo de investigação no intuito de buscar novos métodos de prevenção, diagnóstico e terapêutica dos agravos que envolvem este importante órgão metabólico (ALBERTI et al., 2009; MAHMOOD, ABED, MERKHAN, 2013; PEREIRA et al., 2007; SIMMONS et al., 2010).

A fase inicial das DHGNA é a infiltração lipídica no fígado na ausência de consumo crônico etílico e/ou outras causas conhecidas de doença hepática, podendo progredir para esteatohepatite não-alcoólica, a qual é caracterizada por esteatose, inflamação e fibrose, e em último estágio levando a cirrose (GENTILE, PAGLIASSOTTI, 2008).

A progressão das DHGNA é explicada pela hipótese dos dois “hits”, proposta em 1988 por Day e James (DAY, JAMES, 1998). O primeiro “hit” corresponde à esteatose simples e envolve o acúmulo de TG no fígado, condição que sozinha desencadeia RI e possibilita um círculo vicioso de disfunções metabólicas, propiciando, assim, condições para o desenvolvimento ou aparecimento do segundo “hit”, que envolve inflamação, fibrose e morte celular, características da esteatohepatite (Figura 4).

Figura 4 Esquema simplificado da hipótese dos dois “hits”.



O primeiro hit corresponde a esteatose simples e envolve o acúmulo de triglicerídeos no fígado, desencadeado pela obesidade e SMet. Vários fatores estão envolvidos no aparecimento e progressão do segundo “hit”: estressores ambientais (como o consumo de dietas hiperlipídicas), a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o dano mitocondrial. O segundo “hit” envolve inflamação, fibrose e morte celular característico de esteatohepatite. **Fonte:** adaptado de Mantena et al., 2008.

Vários fatores estão envolvidos na progressão deste segundo “hit” e, devido ao fígado gorduroso ser mais suscetível ao estresse oxidativo, este constitui um dos principais fatores (VIDELA et al., 2004). Nesta condição, a produção elevada de EROs, principalmente decorrente da disfunção mitocondrial, ocorre no tecido hepático (SONG et al., 2014). Este fenômeno é resultante, principalmente, da sobrecarga do sistema de β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa, e em sequência, tem-se a peroxidação lipídica e a indução de citocinas pró-inflamatórias (VIDELA et al., 2004). Em conjunto, estes mecanismos promovem a progressão da esteatohepatite para fibrose e cirrose (GENTILE, PAGLIASSOTTI, 2008; MANTENA et al., 2008; WIECKOWSKA, MCCULLOUGH, FELDSTEIN, 2007).

Além das condições acima citadas, existe uma relação do SRA com outros mecanismos relacionados ao metabolismo hepático. Por um lado, envolvendo o “eixo clássico” do SRA, sabe-se que a deleção do receptor AT1 reduz esteatose hepática (NABESHIMA et al., 2009). Somando-se, a inibição da ação da Ang II pelo antagonismo do receptor AT1 melhora o metabolismo hepático de animais com

SMet (MONTEZ et al., 2012), através da diminuição de TG no fígado, aumento das enzimas antioxidantes e da expressão de UCP2 (proteína desacopladora 2 mitocondrial, cuja função é o controle da produção de oxidantes). Esses resultados sugerem que a ativação AT1 contribui para o prejuízo do metabolismo lipídico e capacidade antioxidante hepática, criando um cenário favorável ao aparecimento da esteatose e esteatohepatite (MONTEZ et al., 2012).

Por outro lado, a ativação do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas contrabalanceia os efeitos negativos citados acima (FELTENBERGER et al., 2013; PEREIRA et al., 2007; OSTERREICHER et al., 2009). Estas ações envolvem a participação da Ang-(1-7) que, por sua vez, diminui os níveis de alanina aminotransferase plasmática, bem como previne a deposição lipídica hepática e, consequentemente, da esteatose (FELTENBERGER et al., 2013). Ademais, demonstrou-se que o antagonismo farmacológico do receptor da Ang-(1-7) (PEREIRA et al., 2007), bem como a deleção da ECA2 em modelos de injúria hepática agrava a fibrose neste órgão central do metabolismo (OSTERREICHER et al., 2009).

Somando-se ao exposto, recentemente demonstrou-se que a deleção do Mas em camundongos ApoE^{-/-} causa, além de um incremento significativo na dislipidemia sistêmica, um aumento nos depósitos de gordura hepática, caracterizando, desta forma, um quadro de esteatose, acompanhado de elevada peroxidação lipídica no fígado e aumento de alanina aminotransferase no soro (SILVA et al., 2013). Esses dados demonstram a importante participação do “jovem eixo” do SRA no metabolismo do fígado e que o desequilíbrio neste eixo pode acarretar em sério dano hepático.

3.2.4.1 Avaliação das DHGNA e marcadores oxidativos: possível papel do UCP2

O estresse oxidativo participa da progressão das DHGNA e esta relação pode decorrer, primeiramente, da sobrecarga de ácidos graxos de cadeia longa para o fígado e, em uma segunda fase, da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) e/ou da saturação das defesas antioxidantes hepáticas (MANTENA et al., 2008; QURESHI, ABRAMS, 2007; UCHIYAMA, SHIMIZU, SHIRASAWA, 2006). Este desequilíbrio pode ocorrer como consequência da diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e glutationa peroxidase (GPx), como também pela elevada

peroxidação lipídica (PACHER et al., 2007; VIDELA et al., 2004). Somando-se a estas vias, os mecanismos inflamatórios também exercem papel relevante. Em conjunto, esses eventos contribuem para a progressão da esteatose para esteatohepatite não alcoólica, fibrose, cirrose e por último, câncer hepático (RAMADORI et al., 2008; UCHIYAMA et al., 2006; VIDELA et al., 2004).

As proteínas desacopladoras mitocondriais (“*mitochondrial uncoupling proteins*”, UCPs) são expressas no interior da membrana mitocondrial e funcionalmente, capazes de promover a oxidação de ácidos graxos, através da cadeia transportadora de elétrons, para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), dissipando, assim, energia metabólica como calor (KUHLA et al., 2010). Dessa forma, sugere-se que modificações na expressão e/ou atividade da UCP2 pode contribuir para a disfunção hepática e eficiência metabólica deste órgão (TIAN et al., 2012).

Os testes laboratoriais rotineiramente incluídos na avaliação clínica de pacientes com suspeita de DHGNA são: a análise sérica da atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (MOFRAD et al., 2003; YBARRA et al., 2014), uma vez que a atividade elevada destas, normalmente, é um indicativo de lesão hepatocelular (HASHIMOTO, TOKUSHIGE, LUDWIG, 2014). Contudo, este incremento na atividade destes marcadores nem sempre é observado em todos os indivíduos com diagnóstico de DHGNA. Ademais, alguns exames por imagem, como a ressonância magnética funcional (BASTATI et al., 2014), apresentam tanto custo elevado como são de difícil acesso à maioria das cidades. Isto posto, muitas são as limitações para a investigação clínica das complicações hepáticas. Assim, em conjunto, estes dados diretamente instigam a busca por novos biomarcadores específicos e considerados potencialmente ideais, isto é, que sejam reprodutíveis, de baixo custo, laboratorialmente disponíveis e que estejam envolvidos no mecanismo fisiopatológico dos agravos hepáticos, inclusive, indicando o estadiamento destes (KOTRONEN, YKI-JARVINEN, 2008; MOFRAD et al., 2003; WIECKOWSKA, MCCULLOUGH, FELDSTEIN, 2007).

Diante disso, ainda não foram descritos biomarcadores sistêmicos específicos que contribuam diretamente para o diagnóstico das DHGNA (BYRNE, TARGHER, 2014; YBARRA et al., 2014). Por outro lado, métodos rotineiros de imagem, como a tomografia computadorizada e ultrassonografia, são empregados (ADIELS, TASKINEN, BOREN, 2008). Entretanto, existe uma limitação na utilização destas

técnicas, seja pela limitada sensibilidade ou especificidade para a obtenção de informações como a presença de inflamação, fibrose e, principalmente, para o estadiamento esteatótico dos padrões micro ao macrovesicular (BASTATI et al., 2014). Este, por sua vez, só é possível invasivamente, por biópsia hepática seguida de estudo histopatológico (HASHIMOTO, TOKUSHIGE, LUDWIG, 2014). Este último exame é, ainda, considerado o “padrão ouro” tanto para quantificação de gordura no fígado como para o diagnóstico da esteatohepatite (KOTRONEN, YKI-JARVINEN, 2008; WIECKOWSKA, MCCULLOUGH, FELDSTEIN, 2007).

Diante da importância do SRA no metabolismo do fígado (MONTEZ et al., 2012; OSTERREICHER et al., 2009; PEREIRA et al., 2007), e que o desequilíbrio desse sistema pode acarretar em sério dano hepático (MONTEZ et al., 2012; NABESHIMA et al., 2009; PEREIRA et al., 2007), somado ao fato de que não há nenhuma correlação entre os testes laboratoriais para diagnóstico das DHGNA e o SRA, faz-se necessário a busca por biomarcadores sistêmicos e/ou a descrição de novos alvos específicos que correlacionem danos hepáticos com o SRA.

3.3 Modelos Animais com Alterações Genéticas para o Eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas

A descoberta de novos componentes do “novo eixo”, bem como a descrição de ações fisiopatológicas relevantes para estes, inseriu o eixo ECA2-Ang-(1-7) Mas definitivamente como elemento essencial para a regulação de diversos sistemas. Dessa forma, considerando-se a severidade das doenças metabólicas, este novo eixo caracteriza-se como uma importante via a ser investigada.

Neste sentido, a tecnologia transgênica para o desenvolvimento de roedores que apresentem deleção ou aumento da expressão de elementos do mais jovem braço do SRA, revela-se essencial tanto para o conhecimento de novas rotas metabólicas como para o melhor entendimento dos mecanismos que interligam este sistema na homeostase, bem como em processos patológicos diversos (SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2013).

As modificações genéticas supracitadas produzem diferentes fenótipos, os quais foram e/ou são essenciais para identificação das ações exercida pelos componentes deste sistema em diferentes órgãos (ALENINA et al., 2008).

Em camundongos, a deleção da ECA2 causa defeitos na contratilidade cardíaca, como demonstrado *in vivo* por Crackower e colaboradores (2002).

Entretanto, trabalho subsequente demonstrou função cardíaca normal no ECA2^{-/-} (GURLEY et al., 2006). Anos mais tarde, Gurley e Coffman (2008) discutem que esta diferença pode ocorrer provavelmente por influência da diferença no “background” genético, de fatores ambientais, bem como metodológicos (como o uso de anestesia para as medidas ecocardiográficas), demonstrando assim a dependência de outros fatores para o fenótipo obtido após a deleção da ECA2.

Somando-se ao exposto, a utilização de animais com deleção genética para ECA2 também permitiu a investigação da participação desta enzima em outras áreas. Observou-se que camundongos ECA2^{-/-} mostram prejuízo na vasodilatação induzida pela acetilcolina na aorta (LOVREN et al., 2008) e disfunção endotelial acompanhada de estresse oxidativo tanto aórtico como sistêmico (RABELO et al., 2015; dados não publicados). Ademais, a deleção da ECA2 exacerba o diabetes renal em camundongos *Akita*, um modelo animal de diabetes *mellitus* do tipo 1 (WONG et al., 2007). A supressão desta enzima em ApoE^{-/-} piora a aterosclerose e inflamação vascular destes animais (SAHARA et al., 2013; THOMAS et al., 2010), além do prejuízo na homeostase da glicose (GURLEY, COFFMAN, 2008; NIU et al., 2008; TAKEDA et al., 2013) e agravamento da fibrose hepática (OSTERREICHER et al., 2009).

Cronologicamente, camundongos Mas^{-/-} foram os primeiros animais geneticamente modificados do SRA (WALTHER et al., 1998). A deleção do receptor Mas em camundongos também permitiu diversas investigações, sendo este animal uma excelente ferramenta para avaliação do papel da Ang-(1-7). Esses roedores apresentam marcada disfunção cardíaca *in vitro* e *in vivo* (SANTOS et al., 2006), prejuízo na função endotelial *in vivo*, estresse oxidativo, elevada pressão sanguínea (RABELO et al., 2008; XU et al., 2008) e disfunção erétil (DA COSTA GONCALVES et al., 2007). Além disso, o efeito da deleção do receptor Mas em “background” FVB/N no metabolismo lipídico e glicídico já foi relatado, as complicações observadas são semelhantes aquelas que caracterizam a SMet, como a dislipidemia, intolerância à glicose e resistência à insulina (SANTOS et al., 2008).

A deleção do receptor Mas em animais ApoE^{-/-} também já foi descrita (SILVA et al., 2013) Essa dupla deleção causa esteatose no fenótipo obtido e agrava o perfil lipídico aterogênico e hepatotóxico nos animais ApoE^{-/-}, sugerindo-se, desta forma, a importante participação do receptor Mas no metabolismo lipídico (SILVA et al., 2013).

Além de modelos animais que apresentam a deleção de algum componente do SRA, outros que apresentam o aumento da expressão também já foram desenvolvidos (RENTZSCH et al., 2008) (SANTOS et al., 2010) (ZHAO et al., 2010), sendo estes utilizados com o mesmo intuito das investigações acima relatadas.

Nesta direção, Rentzsch e colaboradores (2008) geraram um modelo de rato espontaneamente hipertenso que apresenta aumento da expressão de ECA2 em células do músculo liso vascular. Interessantemente, o fenótipo obtido apresentou melhora na função endotelial, além de diminuição da pressão sanguínea. Os autores postulam que, provavelmente, estes efeitos são consequentes à redução do estresse oxidativo associado à diminuição dos níveis de Ang II e aumento de Ang-(1-7) sistêmicos e aórticos (RENTZSCH et al., 2008). Somando-se, Zhao e colaboradores (2010) demonstraram que o aumento da expressão da ECA2 no coração de ratos que apresentam infarto do miocárdio, induzido cirurgicamente, melhora a disfunção ventricular esquerda e protege contra fibrose no miocárdio.

Além destes, em um modelo de rato transgênico que apresenta uma crônica elevação dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7), observou-se uma melhora no metabolismo da glicose e dos lipídios, através do aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina, bem como diminuição de COL, TG e gordura abdominal. Segundo este estudo, o possível mecanismo envolve diminuição da expressão de angiotensinogênio e aumento da ação da AKT no tecido adiposo (SANTOS et al., 2010).

No plano exposto, os estudos envolvendo animais geneticamente modificados para componentes do “novo eixo” do SRA demonstram a importante e decisiva contribuição desta via na homeostase cardiom metabólica. Em conjunto, configuram-se como importantes ferramentas para investigação de novos alvos farmacêuticos e dos mecanismos implicados, mas ainda pouco explorados.

A Tabela 1 summariza os principais modelos transgênicos do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas.

Tabela 1. Modelos transgênicos do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas.

Modelo	“Background”	Transgene/Mutação	Fenótipo	Referência
Camundongo	C57Bl/6	ECA2	- Disfunção cardíaca	(CRACKOWER et al., 2002)
			- Prejuízo na vasodilatação induzida pela acetilcolina na aorta	(LOVREN et al., 2008)
			Disfunção endotelial e estresse oxidativo aórtico e sistêmico	(RABELO et al., 2015; dados não publicados)
			- Injúria glomerular	(OUDIT, HERZENBERG, KASSIRI et al., 2006)
			- Prejuízo na homeostase glicêmica	(NIU et al., 2008; TAKEDA et al., 2013)
			- Fibrose hepática	(OSTERREICHER et al., 2009)
Camundongo	C57Bl/6	ECA2 (Geral superexpressão)	- Aumento da susceptibilidade à infecção pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave	(YANG, DENG, TONG et al., 2007)
Camundongo	Akita	ECA2	- Acelera o diabetes renal	(WONG et al., 2007)
Camundongo	C57Bl/6	ECA2/ApoE	- Piora no processo aterosclerótico e inflamatório	(LOVREN et al., 2008; SAHARA et al., 2013; THOMAS et al., 2010)
Camundongo	C57Bl/6	Mas	- Aumento da resistência vascular e diminuição do fluxo sanguíneo	(BOTELHO-SANTOS et al., 2012)
			- Disfunção cardíaca	(SANTOS et al., 2006)
			- Disfunção endotelial e aumento do estresse oxidativo	(RABELO et al., 2008)
			- Disfunção erétil	(DA COSTA GONCALVES et al., 2007)

			- Trombose	(FRAGA-SILVA, PINHEIRO, GONCALVES et al., 2008)
Camundongo	FVBN	Mas	- Dislipidemia, prejuízo na homeostase glicêmica	(SANTOS et al., 2008)
			- Disfunção endotelial e Hipertensão arterial	(XU et al., 2008)
Camundongo	FVBN	Mas/ApoE	- Esteatose e agravamento do perfil lipídico	(SILVA et al., 2013)
Rato espontaneamente hipertenso		↑ECA2 células do músculo liso vascular	- Melhora da função endotelial e diminuição da pressão sanguínea	(RENTZSCH et al., 2008)
Rato com infarto do miocárdio		↑ECA2 coração	- Melhora disfunção ventricular esquerda endotelial e protege contra fibrose no miocárdio	(ZHAO et al., 2010)
Rato		↑Ang-(1-7) plasmática	- Melhora metabolismo glicêmico e lipídico	(SANTOS et al., 2010)

REFERÊNCIAS

ADIELS, M.; OLOFSSON, S. O.; TASKINEN, M. R.; BOREN, J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 7, p. 1225-36, Jul 2008.

ADIELS, M.; TASKINEN, M. R.; BOREN, J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current Diabetes Reports**, v. 8, n. 1, p. 60-4, Feb 2008.

AGUAYO, A.; VELA, A.; ANIEL-QUIROGA, A.; BLARDUNI, E.; FERNANDEZ, C.; GRAU, G.; NUNEZ, J.; MARTUL, P.; CASTANO, L.; RICA, I. Absence of diabetes mellitus type 2 in obese children and adolescents in the north of Spain. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM**, v. 26, n. 1-2, p. 25-9, 2013.

ALBERTI, K. G.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I.; DONATO, K. A.; FRUCHART, J. C.; JAMES, W. P.; LORIA, C. M.; SMITH, S. C., JR. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-5, Oct 20 2009.

ALENINA, N.; XU, P.; RENTZSCH, B.; PATKIN, E. L.; BADER, M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). **Experimental Physiology**, v. 93, n. 5, p. 528-37, May 2008.

ARKHIPOVA, N. S.; AR'EV, A. L.; POPOVA, E. K.; GRIGOR'EVA, L. V.; KOZINA, L. S. [The connection of polymorphism I/D of the gene angiotensin-converting ferment and D442G gene of protein-carrier of cholesterol ethers with atherosclerosis risk factors in patients of elderly and senile age with coronary heart disease in the Republic Sakha (Yakutia)]. **Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossiiskaia akademia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo**, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2013.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 439-65, 2010.

BANDEIRA SDE, M.; GUEDES GDA, S.; DA FONSECA, L. J.; PIRES, A. S.; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C.; RABELO, L. A.; VASCONCELOS, S. M.; GOULART, M. O. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 819310, 2012.

BASTATI, N.; FEIER, D.; WIBMER, A.; TRAUSSNIGG, S.; BALASSY, C.; TAMANDL, D.; EINSPIELER, H.; WRBA, F.; TRAUNER, M.; HEROLD, C.; BA-SSALAMA, A. Noninvasive Differentiation of Simple Steatosis and Steatohepatitis by Using Gadoxetic Acid-enhanced MR Imaging in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Proof-of-Concept Study. **Radiology**, p. 131890, Feb 27 2014.

BOTELHO-SANTOS, G. A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 6, n. 5, p. 201-11, Oct 2012.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-52, Jul 2004.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. Ectopic Fat, Insulin Resistance, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Apr 17 2014.

CAMERON, A. J.; ZIMMET, P. Z.; SHAW, J. E.; ALBERTI, K. G. The metabolic syndrome: in need of a global mission statement. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 26, n. 3, p. 306-9, Mar 2009.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. **Vascular pharmacology**, v. 57, n. 2-4, p. 91-7, Sep-Oct 2012.

COPELAND, K. C.; SILVERSTEIN, J.; MOORE, K. R.; PRAZAR, G. E.; RAYMER, T.; SHIFFMAN, R. N.; SPRINGER, S. C.; THAKER, V. V.; ANDERSON, M.; SPANN, S. J.; FLINN, S. K. Management of newly diagnosed type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) in children and adolescents. **Pediatrics**, v. 131, n. 2, p. 364-82, Feb 2013.

COTRIM, H. P.; PARISE, E. R.; OLIVEIRA, C. P.; LEITE, N.; MARTINELLI, A.; GALIZZI, J.; SILVA RDE, C.; MATTOS, A.; PEREIRA, L.; AMORIM, W.; IVANTES, C.; SOUZA, F.; COSTA, M.; MAIA, L.; PESSOA, M.; OLIVEIRA, F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals of hepatology**, v. 10, n. 1, p. 33-7, Jan-Mar 2011.

CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J.; DA COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C. M.; MANOUKIAN, A. S.; CHAPPELL, M. C.; BACKX, P. H.; YAGIL, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 822-8, Jun 20 2002.

DA COSTA GONCALVES, A. C.; LEITE, R.; FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; REIS, A. B.; REIS, F. M.; TOUYZ, R. M.; WEBB, R. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 293, n. 4, p. H2588-96, Oct 2007b.

DANILCZYK, U.; SARAO, R.; REMY, C.; BENABBAS, C.; STANGE, G.; RICHTER, A.; ARYA, S.; POSPISILIK, J. A.; SINGER, D.; CAMARGO, S. M.; MAKRIDES, V.; RAMADAN, T.; VERREY, F.; WAGNER, C. A.; PENNINGER, J. M. Essential role for collectrin in renal amino acid transport. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1088-91, Dec 21 2006.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, Apr 1998.

DEN BOER, M.; VOSHOL, P. J.; KUIPERS, F.; HAVEKES, L. M.; ROMIJN, J. A. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 4, p. 644-9, Apr 2004.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation research**, v. 87, n. 5, p. E1-9, Sep 1 2000.

ECKEL, R. H.; ALBERTI, K. G.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 181-3, Jan 16 2010.

ELEUTERIO-SILVA, M. A.; SA DA FONSECA, L. J.; VELLOSO, E. P.; DA SILVA GUEDES, G.; SAMPAIO, W. O.; DA SILVA, W. F.; MOTA-GOMES, M. A.; DA SILVA LIMA, L. V.; SANTOS, R. A.; RABELO, L. A. Short-term cardiovascular physical programme ameliorates arterial stiffness and decreases oxidative stress in women with metabolic syndrome. **Journal of rehabilitation medicine : official journal of the UEMS European Board of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 45, n. 6, p. 572-9, Jun 2013.

ERDELY, A.; KEPKA-LENHART, D.; SALMEN-MUNIZ, R.; CHAPMAN, R.; HULDERMAN, T.; KASHON, M.; SIMEONOVA, P. P.; MORRIS, S. M., JR. Arginase activities and global arginine bioavailability in wild-type and ApoE-deficient mice: responses to high fat and high cholesterol diets. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15253, 2010.

FAZIO, S.; BABAEV, V. R.; MURRAY, A. B.; HASTY, A. H.; CARTER, K. J.; GLEAVES, L. A.; ATKINSON, J. B.; LINTON, M. F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4647-52, Apr 29 1997.

FELTENBERGER, J. D.; ANDRADE, J. M.; PARAISO, A.; BARROS, L. O.; FILHO, A. B.; SINISTERA, R. D.; SOUSA, F. B.; GUIMARAES, A. L.; DE PAULA, A. M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; QURESHI, M.; DOS SANTOS, R. A.; SANTOS, S. H. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 324-30, Aug 2013.

FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; GONCALVES, A. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 1-2, p. 28-35, Jan-Feb 2008.

FRAULOB, J. C.; OGG-DIAMANTINO, R.; FERNANDES-SANTOS, C.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 212-23, May 2010.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.

GASTALDELLI, A.; MIYAZAKI, Y.; PETTITI, M.; MATSUDA, M.; MAHANKALI, S.; SANTINI, E.; DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5098-103, Nov 2002.

GEMBARDT, F.; STERNER-KOCK, A.; IMBODEN, H.; SPALTEHOLZ, M.; REIBITZ, F.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. **Peptides**, v. 26, n. 7, p. 1270-7, Jul 2005.

GENTILE, C. L.; PAGLIASSOTTI, M. J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 9, p. 567-76, Sep 2008.

GILARDI, F.; GIUDICI, M.; MITRO, N.; MASCHI, O.; GUERRINI, U.; RANDO, G.; MAGGI, A.; CERMENATI, G.; LAGHEZZA, A.; LOIODICE, F.; POCHETTI, G.; LAVECCHIA, A.; CARUSO, D.; DE FABIANI, E.; BAMBERG, K.; CRESTANI, M. LT175 is a novel PPARalpha/gamma ligand with potent insulin sensitizing effects and reduced adipogenic properties. **The Journal of Biological Chemistry**, Jan 22 2014.

GUO, Y. J.; LI, W. H.; WU, R.; XIE, Q.; CUI, L. Q. ACE2 overexpression inhibits angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in macrophages. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 2, p. 149-54, Feb 2008.

GURLEY, S. B.; ALLRED, A.; LE, T. H.; GRIFFITHS, R.; MAO, L.; PHILIP, N.; HAYSTEAD, T. A.; DONOGHUE, M.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. L.; ROCKMAN, H. A.; COFFMAN, T. M. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 8, p. 2218-25, Aug 2006.

GURLEY, S. B.; COFFMAN, T. M. Angiotensin-converting enzyme 2 gene targeting studies in mice: mixed messages. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 5, p. 538-42, May 2008.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L.; LELY, A. T.; NAVIS, G.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631-7, Jun 2004.

HASHIMOTO, E.; TOKUSHIGE, K.; LUDWIG, J. Diagnosis and Classification of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Current Concepts and Remaining Challenges. **Hepatology Research :The Official Journal of The Japan Society of Hepatology**, Mar 25 2014.

HASHIMOTO, T.; PERLOT, T.; REHMAN, A.; TRICHEREAU, J.; ISHIGURO, H.; PAOLINO, M.; SIGL, V.; HANADA, T.; HANADA, R.; LIPINSKI, S.; WILD, B.; CAMARGO, S. M.; SINGER, D.; RICHTER, A.; KUBA, K.; FUKAMIZU, A.; SCHREIBER, S.; CLEVERS, H.; VERREY, F.; ROSENSTIEL, P.; PENNINGER, J. M. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 477-81, Jul 26 2012.

HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 25, p. 1954-62, Jun 20 2002.

HOPKINS, P. N. Molecular biology of atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1317-542, Jul 2013.

HU, G.; QIAO, Q.; TUOMILEHTO, J.; BALKAU, B.; BORCH-JOHNSSEN, K.; PYORALA, K. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 10, p. 1066-76, May 24 2004.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, v. 61, n. 6, p. 866-79, Dec 1987.

IGNARRO, L. J.; KADOWITZ, P. J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, p. 171-91, 1985.

IMAI, Y.; KUBA, K.; RAO, S.; HUAN, Y.; GUO, F.; GUAN, B.; YANG, P.; SARAO, R.; WADA, T.; LEONG-POI, H.; CRACKOWER, M. A.; FUKAMIZU, A.; HUI, C. C.; HEIN, L.; UHLIG, S.; SLUTSKY, A. S.; JIANG, C.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 112-6, Jul 7 2005.

JACOBY, D. S.; RADER, D. J. Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease: from genes to treatment. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 10, p. 1155-64, May 26 2003.

JAYASOORIYA, A. P.; MATHAI, M. L.; WALKER, L. L.; BEGG, D. P.; DENTON, D. A.; CAMERON-SMITH, D.; EGAN, G. F.; MCKINLEY, M. J.; RODGER, P. D.; SINCLAIR, A. J.; WARK, J. D.; WEISINGER, H. S.; JOIS, M.; WEISINGER, R. S. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 18, p. 6531-6, May 6 2008.

KAMAGATE, A.; QU, S.; PERDOMO, G.; SU, D.; KIM, D. H.; SLUSHER, S.; MESECK, M.; DONG, H. H. FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2347-64, Jun 2008.

KOTRONEN, A.; YKI-JARVINEN, H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 1, p. 27-38, Jan 2008.

KUBA, K.; IMAI, Y.; PENNINGER, J. M. Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. **Circulation journal : Official Journal of The Japanese Circulation Society**, v. 77, n. 2, p. 301-8, 2013.

KUHLA, A.; HETTWER, C.; MENGER, M. D.; VOLLMAR, B. Oxidative stress-associated rise of hepatic protein glycation increases inflammatory liver injury in uncoupling protein-2 deficient mice. **LaboratoryInvestigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 90, n. 8, p. 1189-98, Aug 2010.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2045-51, Sep 2012.

LIBBY, P.; LICHTMAN, A. H.; HANSSON, G. K. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1092-104, Jun 27 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317-25, May 19 2011.

LOVREN, F.; PAN, Y.; QUAN, A.; TEOH, H.; WANG, G.; SHUKLA, P. C.; LEVITT, K. S.; OUDIT, G. Y.; AL-OMRAN, M.; STEWART, D. J.; SLUTSKY, A. S.; PETERSON, M. D.; BACKX, P. H.; PENNINGER, J. M.; VERMA, S. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 4, p. H1377-84, Oct 2008.

LUDEWIG, B.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Arterial inflammation and atherosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 154-9, May 2002.

MAHMOOD, I. H.; ABED, M. N.; MERKHAN, M. M. Effects of blocking of angiotensin system on the prevalence of metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. **Pakistan journal of Medical Sciences**, v. 29, n. 1, p. 140-3, Jan 2013.

MANTENA, S. K.; KING, A. L.; ANDRINGA, K. K.; ECCLESTON, H. B.; BAILEY, S. M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and

obesity-induced fatty liver diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1259-72, Apr 1 2008.

MARCHEZINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-23, Apr 2003.

MARIO, E. G.; SANTOS, S. H.; FERREIRA, A. V.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; BOTON, L. M. Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 174-7, Jan 2012.

MATHIEU, P.; POIRIER, P.; PIBAROT, P.; LEMIEUX, I.; DESPRES, J. P. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 53, n. 4, p. 577-84, Apr 2009.

MOFRAD, P.; CONTOS, M. J.; HAQUE, M.; SARGEANT, C.; FISHER, R. A.; LUKETIC, V. A.; STERLING, R. K.; SHIFFMAN, M. L.; STRAVITZ, R. T.; SANYAL, A. J. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. **Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 1286-92, Jun 2003.

MOLNAR, J.; YU, S.; MZHAVIA, N.; PAU, C.; CHERESHNEV, I.; DANSKY, H. M. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. **Circulation research**, v. 96, n. 11, p. 1178-84, Jun 10 2005.

MONTEZ, P.; VAZQUEZ-MEDINA, J. P.; RODRIGUEZ, R.; THORWALD, M. A.; VISCARRA, J. A.; LAM, L.; PETI-PETERDI, J.; NAKANO, D.; NISHIYAMA, A.; ORTIZ, R. M. Angiotensin receptor blockade recovers hepatic UCP2 expression and aconitase and SDH activities and ameliorates hepatic oxidative damage in insulin resistant rats. **Endocrinology**, v. 153, n. 12, p. 5746-59, Dec 2012.

MUNIYAPPA, R.; LEE, S.; CHEN, H.; QUON, M. J. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. **American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 294, n. 1, p. E15-26, Jan 2008.

NABESHIMA, Y.; TAZUMA, S.; KANNO, K.; HYOGO, H.; CHAYAMA, K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1226-35, Jun 2009.

NAHRENDORF, M.; MCCARTHY, J. R.; LIBBY, P. Over a hump for imaging atherosclerosis: nanobodies visualize vascular cell adhesion molecule-1 in inflamed plaque. **Circulation Research**, v. 110, n. 7, p. 902-3, Mar 30 2012.

NAKAMOTO, H.; FERRARIO, C. M.; FULLER, S. B.; ROBACZEWSKI, D. L.; WINICOV, E.; DEAN, R. H. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide interaction in renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 25, n. 4 Pt 2, p. 796-802, Apr 1995.

NG, D. S. Diabetic dyslipidemia: from evolving pathophysiological insight to emerging therapeutic targets. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 37, n. 5, p. 319-26, Oct 2013.

NIU, M. J.; YANG, J. K.; LIN, S. S.; JI, X. J.; GUO, L. M. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 leads to impaired glucose homeostasis in mice. **Endocrine**, v. 34, n. 1-3, p. 56-61, Aug-Dec 2008.

OSTERREICHER, C. H.; TAURA, K.; DE MINICIS, S.; SEKI, E.; PENZ-OSTERREICHER, M.; KODAMA, Y.; KLUWE, J.; SCHUSTER, M.; OUDIT, G. Y.; PENNINGER, J. M.; BRENNER, D. A. Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 929-38, Sep 2009.

OUDIT, G. Y.; HERZENBERG, A. M.; KASSIRI, Z.; WONG, D.; REICH, H.; KHOKHA, R.; CRACKOWER, M. A.; BACKX, P. H.; PENNINGER, J. M.; SCHOLEY, J. W. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 6, p. 1808-20, Jun 2006.

OUDIT, G. Y.; KASSIRI, Z.; PATEL, M. P.; CHAPPELL, M.; BUTANY, J.; BACKX, P. H.; TSUSHIMA, R. G.; SCHOLEY, J. W.; KHOKHA, R.; PENNINGER, J. M. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 1, p. 29-39, Jul 1 2007.

OUDIT, G. Y.; LIU, G. C.; ZHONG, J.; BASU, R.; CHOW, F. L.; ZHOU, J.; LOIBNER, H.; JANZEK, E.; SCHUSTER, M.; PENNINGER, J. M.; HERZENBERG, A. M.; KASSIRI, Z.; SCHOLEY, J. W. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 529-38, Feb 2010.

OUDIT, G. Y.; PENNINGER, J. M. Recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 as a new renin-angiotensin system peptidase for heart failure therapy. **Current Heart Failure Reports**, v. 8, n. 3, p. 176-83, Sep 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007.

PAGANO, G.; PACINI, G.; MUSSO, G.; GAMBINO, R.; MECCA, F.; DEPETRIS, N.; CASSADER, M.; DAVID, E.; CAVALLO-PERIN, P.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 367-72, Feb 2002.

PALETAS, K.; ATHANASIADOU, E.; SARIGIANNI, M.; PASCHOS, P.; KALOGIROU, A.; HASSAPIDOU, M.; TSAPAS, A. The protective role of the Mediterranean diet on the prevalence of metabolic syndrome in a population of Greek obese subjects. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 41-5, Feb 2010.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, Jun 11-17 1987.

PATEL, V. B.; BODIGA, S.; BASU, R.; DAS, S. K.; WANG, W.; WANG, Z.; LO, J.; GRANT, M. B.; ZHONG, J.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G. Y. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: a critical role of the angiotensin II/AT1 receptor axis. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1322-35, May 11 2012.

PEIRO, C.; VALLEJO, S.; GEMBARDT, F.; AZCUTIA, V.; HERINGER-WALTHER, S.; RODRIGUEZ-MANAS, L.; SCHULTHEISS, H. P.; SANCHEZ-FERRER, C. F.; WALTHER, T. Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 12, p. 2421-5, Dec 2007.

PEREIRA, R. M.; DOS SANTOS, R. A.; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, V. H.; COSTA, L. P.; DA COSTA DIAS, F. L.; BARCELOS, L. S.; COLLARES, G. B.; SIMOES E SILVA, A. C. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 674-81, Apr 2007.

PINHEIRO, S. V.; FERREIRA, A. J.; KITTEN, G. T.; DA SILVEIRA, K. D.; DA SILVA, D. A.; SANTOS, S. H.; GAVA, E.; CASTRO, C. H.; MAGALHAES, J. A.; DA MOTA, R. K.; BOTELHO-SANTOS, G. A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. **Kidney International**, v. 75, n. 11, p. 1184-93, Jun 2009.

QUILLARD, T.; LIBBY, P. Molecular imaging of atherosclerosis for improving diagnostic and therapeutic development. **Circulation Research**, v. 111, n. 2, p. 231-44, Jul 6 2012.

QURESHI, K.; ABRAMS, G. A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 26, p. 3540-53, Jul 14 2007.

RABELO, L. A.; ALENINA, N.; BADER, M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. **Hypertension Research**, v. 34, n. 2, p. 154-60, Feb 2011.

RABELO, L. A.; XU, P.; TODIRAS, M.; SAMPAIO, W. O.; BUTTGEREIT, J.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; ALENINA, N. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 2, n. 6, p. 418-24, Nov-Dec 2008.

RAMADORI, G.; MORICONI, F.; MALIK, I.; DUDAS, J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. **Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of The Polish Physiological Society**, v. 59 Suppl 1, p. 107-17, Aug 2008.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v. 306, n. 5939, p. 174-6, Nov 10-16 1983.

REINEHR, T. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 6, p. 270-281, Dec 15 2013.

RENTZSCH, B.; TODIRAS, M.; ILIESCU, R.; POPOVA, E.; CAMPOS, L. A.; OLIVEIRA, M. L.; BALATATU, O. C.; SANTOS, R. A.; BADER, M. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 967-73, Nov 2008.

ROBBINS, C. S.; HILGENDORF, I.; WEBER, G. F.; THEURL, I.; IWAMOTO, Y.; FIGUEIREDO, J. L.; GORBATOV, R.; SUKHOVA, G. K.; GERHARDT, L. M.; SMYTH, D.; ZAVITZ, C. C.; SHIKATANI, E. A.; PARSONS, M.; VAN ROOIJEN, N.; LIN, H. Y.; HUSAIN, M.; LIBBY, P.; NAHRENDORF, M.; WEISSLEDER, R.; SWIRSKI, F. K. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 9, p. 1166-72, Sep 2013.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **The American Journal of Physiology**, v. 250, n. 5 Pt 2, p. H822-7, May 1986.

SAHARA, M.; IKUTOMI, M.; MORITA, T.; MINAMI, Y.; NAKAJIMA, T.; HIRATA, Y.; NAGAI, R.; SATA, M. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 promotes the development of atherosclerosis and arterial neointima formation. **Cardiovascular Research**, Nov 23 2013.

SAMPAIO, W. O.; SOUZA DOS SANTOS, R. A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L. T.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185-92, Jan 2007.

SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. I153-7, Feb 1988.

SANTOS, R. A.; CASTRO, C. H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S. V.; ALMEIDA, A. P.; PAULA, R. D.; CRUZ, J. S.; RAMOS, A. S.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G. T.; FERREIRA, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. **Hypertension**, v. 47, n. 5, p. 996-1002, May 2006.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **The Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R1-R17, Feb 2013.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258-63, Jul 8 2003.

SANTOS, S. H.; BRAGA, J. F.; MARIO, E. G.; PORTO, L. C.; RODRIGUES-MACHADO MDA, G.; MURARI, A.; BOTION, L. M.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 5, p. 953-61, May 2010.

SANTOS, S. H.; FERNANDES, L. R.; MARIO, E. G.; FERREIRA, A. V.; PORTO, L. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BOTION, L. M.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 340-7, Feb 2008.

SATO, T.; SUZUKI, T.; WATANABE, H.; KADOWAKI, A.; FUKAMIZU, A.; LIU, P. P.; KIMURA, A.; ITO, H.; PENNINGER, J. M.; IMAI, Y.; KUBA, K. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 12, p. 5203-11, Dec 2 2013.

SCHIAVONE, M. T.; SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 11, p. 4095-8, Jun 1988.

SHIMOKAWA, H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 23-37, Jan 1999.

SILVA, A. R.; AGUILAR, E. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; DA SILVA, R. F.; ARANTES, R. M.; BADER, M.; ALENINA, N.; PELLI, G.; LENGLER, S.; GALAN, K.; MONTECUCCO, F.; MACH, F.; SANTOS, S. H.; SANTOS, R. A. Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 11, p. R1323-30, Dec 2013.

SIMMONS, R. K.; ALBERTI, K. G.; GALE, E. A.; COLAGIURI, S.; TUOMILEHTO, J.; QIAO, Q.; RAMACHANDRAN, A.; TAJIMA, N.; BRAJKOVICH MIRCHOV, I.; BEN-NAKHI, A.; REAVEN, G.; HAMA SAMBO, B.; MENDIS, S.; ROGLIC, G. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. **Diabetologia**, v. 53, n. 4, p. 600-5, Apr 2010.

SINGER, D.; CAMARGO, S. M.; RAMADAN, T.; SCHAFER, M.; MARIOTTA, L.; HERZOG, B.; HUGGEL, K.; WOLFER, D.; WERNER, S.; PENNINGER, J. M.; VERREY, F. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 6, p. G686-95, Sep 15 2012.

SONG, B. J.; AKBAR, M.; ABDELMEGEED, M. A.; BYUN, K.; LEE, B.; YOON, S. K.; HARDWICK, J. P. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. **Redox Biology**, v. 3, p. 109-23, 2014.

TAKATA, H.; YAMADA, H.; KAWAHITO, H.; KISHIDA, S.; IRIE, D.; KATO, T.; WAKANA, N.; MIYAGAWA, S.; FUKUI, K.; MATSUBARA, H. Vascular angiotensin II type 2 receptor attenuates atherosclerosis via a kinin/NO-dependent mechanism. **Journal of The Renin-Angiotensin-Aldosterone System : JRAAS**, Jun 4 2013.

TAKEDA, M.; YAMAMOTO, K.; TAKEMURA, Y.; TAKESHITA, H.; HONGYO, K.; KAWAI, T.; HANASAKI-YAMAMOTO, H.; OGURO, R.; TAKAMI, Y.; TATARA, Y.; TAKEYA, Y.; SUGIMOTO, K.; KAMIDE, K.; OHISHI, M.; RAKUGI, H. Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 223-33, Jan 2013.

TESANOVIC, S.; VINH, A.; GASPARI, T. A.; CASLEY, D.; WIDDOP, R. E. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 8, p. 1606-13, Aug 2010.

THATCHER, S. E.; ZHANG, X.; HOWATT, D. A.; LU, H.; GURLEY, S. B.; DAUGHERTY, A.; CASSIS, L. A. Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency in whole body or bone marrow-derived cells increases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-/- mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 4, p. 758-65, Apr 2011.

THOMAS, M. C.; PICKERING, R. J.; TSOROTES, D.; KOITKA, A.; SHEEHY, K.; BERNARDI, S.; TOFFOLI, B.; NGUYEN-HUU, T. P.; HEAD, G. A.; FU, Y.; CHIN-DUSTING, J.; COOPER, M. E.; TIKELLIS, C. Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. **Circulation Research**, v. 107, n. 7, p. 888-97, Oct 1 2010.

TIAN, X. Y.; WONG, W. T.; XU, A.; LU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEANG, W. S.; WANG, Y.; YAO, X.; HUANG, Y. Uncoupling protein-2 protects endothelial function in diet-induced obese mice. **Circulation Research**, v. 110, n. 9, p. 1211-6, Apr 27 2012.

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-43, Oct 27 2000.

UCHIYAMA, S.; SHIMIZU, T.; SHIRASAWA, T. CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31713-9, Oct 20 2006.

VERMA, A.; SHAN, Z.; LEI, B.; YUAN, L.; LIU, X.; NAKAGAWA, T.; GRANT, M. B.; LEWIN, A. S.; HAUSWIRTH, W. W.; RAIZADA, M. K.; LI, Q. ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. **Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 20, n. 1, p. 28-36, Jan 2012.

VIDELA, L. A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; QUINONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A.; ROJAS, J.; MALUENDA, F.; BURDILES, P.; DIAZ, J. C.; SMOK, G.; THIELEMANN, L.; PONIACHIK, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clinical Science**, v. 106, n. 3, p. 261-8, Mar 2004.

WALTHER, T.; BALSCHUN, D.; VOIGT, J. P.; FINK, H.; ZUSCHRATTER, W.; BIRCHMEIER, C.; GANTEN, D.; BADER, M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11867-73, May 8 1998.

WANG, Y.; TIKELLIS, C.; THOMAS, M. C.; GOLLEDGE, J. Angiotensin converting enzyme 2 and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 226, n. 1, p. 3-8, Jan 2013.

WIECKOWSKA, A.; MCCULLOUGH, A. J.; FELDSTEIN, A. E. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 582-9, Aug 2007.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 11, n. 3-4, p. 93-102, Apr-May 2001.

WONG, D. W.; OUDIT, G. Y.; REICH, H.; KASSIRI, Z.; ZHOU, J.; LIU, Q. C.; BACKX, P. H.; PENNINGER, J. M.; HERZENBERG, A. M.; SCHOLEY, J. W. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 438-51, Aug 2007.

XIE, X.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHANG, F.; LIU, Y. Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. **Life Sciences**, v. 78, n. 19, p. 2166-71, Apr 4 2006.

XU, P.; COSTA-GONCALVES, A. C.; TODIRAS, M.; RABELO, L. A.; SAMPAIO, W. O.; MOURA, M. M.; SANTOS, S. S.; LUFT, F. C.; BADER, M.; GROSS, V.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 574-80, Feb 2008.

YANG, J.; TAN, Y.; ZHAO, F.; MA, Z.; WANG, Y.; ZHENG, S.; EPSTEIN, P. N.; YU, J.; YIN, X.; ZHENG, Y.; LI, X.; MIAO, L.; CAI, L. Angiotensin II plays a critical role in diabetic pulmonary fibrosis most likely via activation of NADPH oxidase-mediated nitrosative damage. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 1, p. E132-44, Jul 2011.

YANG, X. H.; DENG, W.; TONG, Z.; LIU, Y. X.; ZHANG, L. F.; ZHU, H.; GAO, H.; HUANG, L.; LIU, Y. L.; MA, C. M.; XU, Y. F.; DING, M. X.; DENG, H. K.; QIN, C. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. **Comparative Medicine**, v. 57, n. 5, p. 450-9, Oct 2007.

YBARRA, J.; FERNANDEZ, S.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.; ROMEO, J. H.; BALLESTA-LOPEZ, C.; GUELL, J.; MEARIN, F. Serum alanine aminotransferase predicts interventricular septum thickness and left ventricular mass in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 26, n. 6, p. 654-60, Jun 2014.

ZECHINI, B.; PASQUAZZI, C.; ACETI, A. Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 9, p. 891-6, Sep 2004.

ZHANG, C.; ZHAO, Y. X.; ZHANG, Y. H.; ZHU, L.; DENG, B. P.; ZHOU, Z. L.; LI, S. Y.; LU, X. T.; SONG, L. L.; LEI, X. M.; TANG, W. B.; WANG, N.; PAN, C. M.; SONG, H. D.; LIU, C. X.; DONG, B.; ZHANG, Y.; CAO, Y. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 36, p. 15886-91, Sep 7 2010.

ZHANG, H.; WADA, J.; HIDA, K.; TSUCHIYAMA, Y.; HIRAGUSHI, K.; SHIKATA, K.; WANG, H.; LIN, S.; KANWAR, Y. S.; MAKINO, H. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17132-9, May 18 2001.

ZHAO, Y. X.; YIN, H. Q.; YU, Q. T.; QIAO, Y.; DAI, H. Y.; ZHANG, M. X.; ZHANG, L.; LIU, Y. F.; WANG, L. C.; LIU DE, S.; DENG, B. P.; ZHANG, Y. H.; PAN, C. M.; SONG, H. D.; QU, X.; JIANG, H.; LIU, C. X.; LU, X. T.; LIU, B.; GAO, F.; DONG, B. ACE2 overexpression ameliorates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of myocardial infarction. **Human Gene Therapy**, v. 21, n. 11, p. 1545-54, Nov 2010.

ZHONG, J.; BASU, R.; GUO, D.; CHOW, F. L.; BYRNS, S.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H.; WANG, X. H.; PENNINGER, J. M.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G. Y. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. **Circulation**, v. 122, n. 7, p. 717-28, 18 p following 728, Aug 17 2010.

4 CAPÍTULO 1 - ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

4.1 Artigo derivado da Tese: “ACE2-null mice are protected from high-fat diet-induced obesity”

Artigo a ser submetido ao periódico *The Journal of Clinical Investigation*

Endereço eletrônico do periódico <http://www.jci.org/>

ACE2-null mice are protected from high-fat diet-induced obesity

**Nunes-Souza,V.^{1,2,3}, Alenina, N.¹, Qadri, F.¹, Mosienko, V.¹, Penninger, J.M.⁴,
Santos, R.A.S.^{1,3}, Bader, M.¹, Rabelo, L.A.^{1,2,3}**

¹Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin/Germany. ²Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC), Setor de Fisiologia e Farmacologia, ICBS/UFAL. Maceió/AL/Brazil. ³National Institute of Science and Technology in NanoBiopharmaceutics (N-BIOFAR), Brazil. ⁴Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria.

Corresponding authors:

Prof Dr. Luíza A. Rabelo

Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, CEP: 57072-900, Maceió, AL, Brazil.

Phone: +55 82 3223-5613

Fax: +55 82 3221-2501

Email: luizaa.rabelo@gmail.com

Dr. Natalia Alenina

Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine

Robert-Rössle-str. 10

13125, Berlin, Germany

Tel: +493094063576

Fax: +493094062110

Email: alenina@mdc-berlin.de

Running Head

ACE2 deletion protects against HFD-induced obesity

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Introduction: Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) represents an important component of the renin-angiotensin system. **Objective:** Our aim was to investigate the metabolic profile during the lifespan in ACE2-deficient mice (ACE2^{-/y}). **Methods:** Male adult C57Bl/6 (WT) and ACE2^{-/y} (KO) mice were analyzed at the age of 3, 6 and, 12 months under standard (SD) diet, and at the age of 6 and 12 months after high fat (HFD) diet. **Results:** Under SD, ACE2^{-/y} showed lower body weight (BW) at all ages investigated. This difference was even more pronounced after HFD in 6-month-old mice, but, interestingly, was blunted at the age of 12 months. The BW reduction was accompanied by decreased white adipose tissue (WAT) content in ACE2^{-/y}. For all groups, no significant changes were observed in fasting glucose and insulin levels, but the ACE2^{-/y} showed improved glucose tolerance and enhanced insulin sensitivity, even after HFD. Moreover, ACE2^{-/y} have lower levels of total cholesterol, triglyceride, non-esterified fatty acid, and leptin in plasma. On the other hand, the adiponectin levels in plasma were higher in ACE2^{-/y}. In addition, ACE2^{-/y} showed a significant decrease in lipolysis under both chow and HFD. **Conclusion:** The deletion of ACE2 interferes with glycemic/lipid, and BW homeostasis. ACE2^{-/y} are protected from HFD-induced obesity, probably by an age-dependent mechanism.

Key words: ACE2 knockout, renin angiotensin system, lipodystrophy, obesity.

Introduction

The discovery of the new components of the renin-angiotensin system (RAS) and the description of relevant physiological actions for these, definitely inserted the triad Angiotensin-converting enzyme type 2 (ACE2), Angiotensin 1 to 7 (Ang-(1-7)), and Mas receptor (MasR), the so-called ACE2/Ang-(1-7)MasR axis, as an essential participant in the regulation of several systems (1-5). Thus, considering the severity of metabolic diseases, this newly described arm is characterized as an important pathway to be mechanistically investigated.

The pathological accumulation of adipose tissue is one of major risk factors for cardiovascular disease (6). In this context, studies also involving the RAS, have largely been conducted to better understand the metabolic and cardiovascular pathophysiology, in both animals (1-3, 5) and humans (6, 7).

ACE2 is a pivotal component of the RAS, which functions as a peptidase that hydrolyzes angiotensin I (AngI) and angiotensin II (AngII) into angiotensin-(1-9) (Ang-(1-9)) and angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)), respectively (8, 9). This enzyme is therefore considered as a negative regulator of the RAS for decreasing the levels of AngII, a vasoconstrictor molecule, and increasing the Ang-(1-7), a vasodilator molecule, conferring the ACE2 a protective role in cardiovascular diseases (10-12) .

Metabolic studies demonstrated the role of the ACE2/Ang-(1-7)MasR pathway in physiological homeostasis (13-15). Besides the important function in cardiovascular homeostasis, recently, ACE2 was described as a regulator of amino acid transport (16, 17), being also capable of inhibiting liver fibrosis (18), protecting against the development of diabetic retinopathy (19) and acute lung failure (20), with the genetic deletion of this enzyme leading to endothelial dysfunction and redox imbalance in mice (21). ACE2 has been shown to be a pleiotropic enzyme (16, 22)

and the impairment in its expression or activity leads to, among others, cardiac (10), vascular (2, 23) and renal disorders (24).

However, the precise role of ACE2 in lipid metabolism remains unclear. In this context, considering the emersion of metabolic diseases and the multifunctionality of the ACE2, our aim was to investigate the metabolic profile in ACE2-deficient mice, especially in regard to systemic metabolism of lipids and glucose.

Here, we showed that the deletion of ACE2 decreases the white adipose tissue and the susceptibility to high fat diet-induced obesity. In addition, this deletion promoted an improvement in glucose profile and insulin pathway systemically.

Results

ACE2 deficiency decreases body weight, fat depot and lipid profile

To reveal the role of ACE2 in the metabolism of fat, we evaluated body weight (BW) and fat depot. Under standard diet (SD), ACE2^{-/-} showed lower BW at all ages investigated compared to WT (Figure 1A). This difference was even more pronounced after high fat diet (HFD) in 6-month-old mice, but, surprisingly, was blunted at the age of 12 months (Figure 1A).

Under SD, the BW reduction was accompanied by decreased total fat in 6 and 12month-old mice (Figure 1B) and white adipose tissue (WAT) index was also found to be decreased in 3, 6 and 12-month-old (Figure 1C) ACE2^{-/-} mice. The significant decrease of fat depot in ACE2^{-/-} was even more pronounced at the age of 6 months after 22 weeks of HFD, but not at the age of 12 months. In addition, ACE2^{-/-} displayed a decrease of white adipocyte diameter in both SD (Figure 1D). Since the ACE2^{-/-} mice have less visceral fat deposition and lower BW, we evaluated the lipid profile in these animals. Under SD, triglycerides (TG) and total cholesterol (TCOL)

levels in plasma were significantly lower in 6-month-old ACE2^{-/y} mice, but not at the age of 12 months (Table 2). In addition, the ACE2 deletion provoked a significant decrease of non-esterified fatty acids (NEFA) levels in all ages under isocaloric condition (Table 2), but under HFD these differences disappeared.

To assess whether the capacity of breakdown of lipids was altered due to the significant decrease of fat depot, we evaluated the lipolysis in WAT. *In vivo*, ACE2^{-/y} mice presented lower NEFA release after selective β3-adrenoceptor agonist stimulation in both SD and HFD when compared to WT mice (Figure 2A). However, *in vitro*, these differences were not observed anymore (Figure 2B). We also evaluated the levels of TCOL, TG, glucose and adiponectin in the plasma collected during the test. The levels of TCOL, TG and glucose did not change between the groups, but adiponectin was significant increase in ACE2^{-/y} compare to the WT under SD. Under HFD, TG and glucose levels were not different between the groups, but TCOL was significant decrease. Intriguingly, adiponectin was significant increase in ACE2 compare to the WT mice (Figure 2C-F).

In order to understand the mechanism of lipolysis in ACE2^{-/y}, we evaluated the expression of target genes in WAT. The results showed that, under SD, the mRNA for lipoprotein lipase (*LPL*) and adrenergic β3-receptor (*Adrβ3*), both involved in fatty acid metabolism, did not change between the groups in 6-month-old mice, but were significantly decreased in 12-month-old ACE2^{-/y} mice. Interestingly, under HFD the levels of mRNA for *Adrβ3* significantly increased in ACE2^{-/y} in both 6 and 12-month-old mice. The hormone-sensitive lipase (*HSL*) expression in WAT, lipase that hydrolyzes stored triglycerides to free fatty acids, was significantly increased in ACE2^{-/y} 6 months under SD and HFD but not 12-month-old mice (Figure 2G-I).

As expected, according to the amount of WAT, ACE2^{-/y} presented higher adiponectin and lower leptin levels in plasma, with the same holding true for the gene expression of leptin and adiponectin in WAT compared to WT (Figure 2J-M).

Role of ACE2 deficiency in glucose and insulin signaling

Under SD, no significant changes were observed in fasting glucose between ACE2^{-/y} and WT groups at all ages. Compared with SD, the HFD increased fasting glucose levels in both WT and ACE2^{-/y} (Table 2). However, under SD, the ACE2^{-/y} showed improved glucose tolerance at the age of 6 and 12 months, but not in 3month-old mice (Figure 3A-C), and enhanced insulin sensitivity at all ages (Figure 3D-F). After HFD-induced glucose intolerance and insulin resistance, ACE2^{-/y} mice continued to present better glucose tolerance and insulin sensitivity compared to WT mice (Figure 3).

To assess whether the high insulin sensitivity in ACE2^{-/y} group was due to elevated insulin levels, we measured this parameter during fasting. The results showed that there were no changes in plasma insulin levels between the groups under SD, but such levels decreased significantly in ACE2^{-/y} in 6-month-old mice under HFD when compared to WT mice (Table 2).

We also evaluated the levels of target genes for glucose and insulin in WAT and muscle. Under SD, 6-month-old ACE2^{-/y} mice showed increased levels of insulin receptor (*IR*) in both organs, and under HFD remained increased in WAT but not in the muscle, which may partly explain the increased insulin sensitivity in ACE2^{-/y} animals even after HFD ingestion. Under SD, no difference was observed in the levels of glucose transporter type 4 (*GLUT4*) in both WAT and muscle, but such levels were significantly increased in WAT from ACE2^{-/y} after HFD (Figure 3G-J). In

both, WAT and muscle, no difference in *IR* and *GLUT4* was observed between the old groups.

Role of ACE2 in energy balance

The balance between energy intake and expenditure reflects in the control of BW. Both food intake and energy expenditure were decreased in ACE2^{-/y} 6-month-old compared to WT mice fed either SD or HFD (Table 2). On the other hand, liquid intake was increased in ACE2^{-/y}. However, at the age of 3 months, the food and liquid intake did not change between the groups and energy expenditure was increase in ACE2^{-/y}, suggesting that the reduction in BW and adipose mass observed in ACE2^{-/y} mice not necessary could be due to a decrease in food intake.

Discussion

The major finding of the present study is that the ACE2-null mice are protected from HFD-induced obesity. This deletion causes metabolic paradoxical effects: on the one hand, a marked diminished BW and WAT associated to lower susceptibility to HFD-induced obesity and insulin resistance. On the other hand, it probably leads to the lipodystrophy in ACE2^{-/y} mice. These novel findings suggest that ACE2 and/or its axis play an important role in lipid metabolism.

First of all, we observed that ACE2 deletion leads to a diminished BW in three different ages, 3, 6 and 12 months old, and also in WAT depots. In order to investigate the role of ACE2 in a pathological condition, further evaluation was performed under HFD. So that, under HFD, ACE2^{-/y} mice showed lower susceptibility to HFD-induced obesity at the age of 6 months but not in 12 months old.

The phenotype of ACE^{-/-} mice is similar to ACE2^{-/-} found in present work, ACE^{-/-} mice had lower BW, body fat and plasma leptin (25). The authors did not associate these findings to decreased food intake, since no differences were detected in daily food intake in ACE^{-/-} mice, but associated to a high energy expenditure related to increased metabolism of fatty acids in the liver. We can suggest two possibilities for the similarity found between this work and ours: the decrease of the action of Ang-(1-7) in both *knockout* animals or the inherent activity of the ACE2, since this enzyme presents RAS-independent function.

Since the ACE2^{-/-} mice have less visceral fat deposition and lower BW, we evaluated the lipolysis capacity. After *in vivo* β₃ agonist-induced lipolysis, ACE2^{-/-} mice presented lower NEFA release in plasma, even under HFD. This is probably due to the diminished fat depots and adipocyte diameter in these animals even after the HFD intake. Additional evidence from the evaluation of systemic lipid profile in plasma at the end of experimental time showed that levels of TCOL, TG and NEFA in ACE2^{-/-} mice were lower than in control mice. On the other hand, the lipolysis *in vitro* did not show a significant difference between ACE2^{-/-} and WT in both SD and HFD condition. In this sense, it is plausible to consider the existence of a systemic factor which could be influencing the lower release of NEFA in ACE2^{-/-} *in vivo*, because when adipose tissue was stimulated isolated with the same agonist, the results for both groups were similar.

Leptin plays a key role in regulating energy intake and expenditure, and the levels of this protein in the blood positively correlate with adipose mass. This corroborates with our findings that ACE2^{-/-} presented diminished fat depots and decreased plasma leptin levels and also the mRNA expression in WAT. We expected an increase in food intake, since the hypothalamus recognizes that the

body has less leptin, stimulating the food intake and decreasing the energy expenditure. As expected, in 6-month-old ACE2^{-/-} mice showed diminished energy expenditure, but, surprisingly, the food intake was decreased, and this might explain, partly, the lower fat depots in ACE2^{-/-} mice and their lower susceptibility to HFD-induced obesity in this age, but not in 3-month-old, since at this last age the food intake did not change between the groups, suggesting that the reduction in BW and adipose mass observed in ACE2^{-/-} mice 3-month-old not necessary could be due to a decrease in food intake.

Following the lipolytic pathway in adipocytes, the gene target for the *adrenergic β3 agonist* showed an increase after HFD. This could also explain the lower susceptibility that ACE2^{-/-} mice have to HFD-induced obesity, by probably up regulation of this pathway. Additional evidence to corroborate this finding comes from *HSL* expression in WAT that was increased in 6-month-old ACE2^{-/-} mice. Based on these results, we expected the levels of NEFA in plasma to be increased, but they were not. In this sense, we speculated the possibility that the circulating lipids could be accumulated ectopically and due to this, ACE2^{-/-} mice showed decreased lipid levels in plasma.

Takeda et al (26) previously reported that ACE2^{-/-} mice, under standard diet feeding, had normal insulin sensitivity and glucose tolerance. Nevertheless, after HFD these parameters were impaired. It is important to consider, however, that the experimental conditions while evaluating the glucose metabolism can affect the results, often by stress to the animals or the use of anesthesia, which are known to affect glucose metabolism (27). Also, the age of animals could affect this evaluation since the genetic background may not be already established in young animals. Therefore, the difference between our findings and theirs might be due to the use of

anesthesia in their experiments, and to the use of young ACE2^{-/-} mice (12-week-old animals). Moreover, we can attribute our metabolic results to the lower deposit of WAT in ACE2^{-/-} mice, a fact not evaluated by the aforementioned authors, since they did not perform the experiment of the body composition in the animals.

In our work, we speculated that the improvement in insulin sensitivity in ACE2^{-/-} mice may occur due to the increase of plasma adiponectin (as a result of decreased fat depots), observed in this mice model, or due to high expression of *insulin receptor* mRNA in WAT and muscle. Adenoviral adiponectin overproduction in *knockout* mice for this adipokine ameliorates diet-induced insulin resistance (28). Additionally, Combs et al (29) identified a dominant mutation in the collagenous domain of adiponectin that elevated circulating it levels in mice and also improved insulin sensitivity (29).

Despite the association between advanced age and consumption of high-fat diet, conditions that are already known to favor the onset of metabolic diseases (30), the deletion of ACE2 did not change, at the age of 12 months, BW, fat deposition or plasma lipid profile compare to the WT in the same condition, suggesting that ACE2 in an old age no more interfere in these parameters as observed at younger ages and that the mechanism of protection against HFD-induced obesity could be age-dependent. Based on this, we have chosen 6 months old as the age that best represents the phenotype resulting from the deletion of ACE2.

Based on the results observed in ACE2^{-/-} mice, we speculate the possibility of ectopic lipid deposit in the liver, the first organ to receive the venous blood from the bowels, carrying the fat after the digestive process (31, 32) and/or the increased fecal fat excretion. However, we cannot discard the possibility of fat accumulation in

another organ after the consumption of HFD. Hence, others investigations are following to confirm these hypotheses.

Taken together, the large body of experimental evidence and our results show that the balance between the two essential axis in the renin-angiotensin system, ACE–AngII–AT1 and ACE2–Ang-(1–7)–Mas axis signaling, help the body to maintain its capacity to metabolize fat to energy maintenance.

In sum, in addition to promoting protection against HFD-induced obesity and systemic injury on glucose and insulin signaling, ACE2 deletion may also, under SD, impair lipid homeostasis, resulting in lipodystrophy. It is important to highlight that this action can be an intrinsic feature of the RAS or not, since ACE2 is a multifunctional enzyme not fully explored.

Conclusions

The ACE2 phenotype described in this work could be explained by metabolic adaptations. A first explanation could be that ACE2 deletion produced effects in lipid metabolism: diminished BW and WAT associated to lower susceptibility to HFD-induced obesity. On the other hand, probably due to reduction in fat depot, ACE2 deletion leads to improvement in the glycemic metabolism systemically. Our data points to an important role of the ACE2 in the systemic lipid metabolism, indicating that both signaling, ACE–AngII–AT1 and ACE2–Ang-(1–7)–Mas axes, must be in balance for the maintenance of normal lipid and glucose metabolism in the body. Furthermore, ACE2^{-/-} could represent a new animal model for lipodystrophy, and interesting research tool for both new treatments and to understanding the signaling pathways involving metabolic events.

Materials and Methods

Animals and experimental procedures

C57Bl/6 (WT) and ACE2 deletion ($\text{ACE2}^{-/-}$) male mice were used in this study in accordance with the German animal protection law and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 86–23, 1996). $\text{ACE2}^{-/-}$ mice on C57BL/6 genetic background were purchased from Dr. Penninger (Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria), and were bred and housed in the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine. The generation of double knockout ApoE- $\text{ACE2}^{-/-}$ was obtained by backcrossed of single knockout strains during 10 generations. The genetic identity was confirmed by tail genotyping at each generation. During all the experimental period, mice were kept on a 12-hour light/dark cycle, fed *ad libitum*, with controlled humidity and temperature environment.

The $\text{ACE2}^{-/-}$ mice used in this work were at the age of 3, 6 and, 12 months under the standard diet (SD, 10% kcal from fat) and at the age of 6 and 12 months after 20-22 weeks of high fat diet (HFD, D12451, 45% kcal from fat), both diets from SSNIF® (Spezialitäten, Soest, Germany). The ApoE- $\text{ACE2}^{-/-}$ mice used were at the age of 6 months under SD.

Glucose tolerance and insulin sensitivity test

The glucose tolerance test were performed after an overnight fast (12h). The animals were weighed and the blood was collected from tail vein for measuring glucose before the injection of $2\text{g glucose} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{i.p}$ (Glucose, Merck®, Darmstadt,

Germany). After injection, the glucose levels were measured at 15, 30, 60, 90 and 120 minutes.

Insulin sensitivity test was assessed with the animal in fed state. Similar to the aforementioned test, the animals were weighed and the blood was collected for measuring glucose before the injection of 0.75 units insulin.kg⁻¹, i.p (Huminsulin®, Lilly, Indianapolis, IN) and after injection at 15, 30, 60, 90 and 120 minutes. All blood glucose was measured using glucometer (Accu-Chek AVIVA, Roche®, Mannheim, Germany).

Metabolic Cage System

Mice were adapted in metabolic cages for 2 days. After this, the measurement of 24 hour activity, energy expenditure, food and water consumption was performed using a combined indirect calorimetry system (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) during three days. Results were expressed as the average of three days.

Body Composition *in vivo*

The body composition was performed in nonanesthetized mice using the Brucker® minispec LF90II nuclear magnetic resonance imaging (NMR) analyzer mq10 (Brucker Optics, Woodlands, USA). In the test, mice were individually placed in small tubes and then inserted into a NMR analyzer. The total fat, was recorded.

Lipolysis *in vivo* and *in vitro*

Lipolysis *in vivo* was performed by administration of 1mg.kg⁻¹;i.p selective β3-adrenoreceptor agonist CL-316,243 hydrate (C5976; Sigma-Aldrich®, Seelze,

Germany). The NEFA were measured in blood collected from tail vein, before the administration (basal), 15 and 30 min after the administration.

Lipolysis *in vitro* was performed in white adipose tissue collected after euthanasia. The tissue was incubated in a medium of culture (DMEM, Gibco® 11880; Darmstadt, Germany) in a bath (37 °C; 95% O₂; 5% CO₂) for 30 minutes for collection of basal time (Time 0) and, immediately after that, the medium was imbued with β3-adrenoceptor agonist CL-316,243 0,1mM. The free fatty acids were measured in the medium in 0, 90 and 180 min of incubation and normalized by the amount of fat used for stimulation.

Euthanasia and organ collection

After intraperitoneal anesthesia using a xilazine/ketamine solution (10/110, mg.kg⁻¹), the animals were sacrificed by exsanguination through cardiac puncture of the right ventricle. The whole blood was collected, centrifuged (4,000rpm for 10 min), and plasma was separated and stored at -80°C until biochemical analyses were performed. The animals were perfused with heparinized saline and, in sequence, WAT and gastrocnemius muscle were carefully removed, weighed, immediately frozen in dry ice and stored at -80°C until quantitative PCR and the other analyses were performed. WAT index was calculated using the following formula: WAT index (%) = {(Epididymal fat + Perirenal fat)/(Body Weight)}*100.

Biochemical analyses

For measurement of insulin, leptin and adiponectin, we used ELISA assay (Millipore®, Schwalbach, Germany) according to the manufacturers' instructions. A Wako NEFA kit was used to measure plasma and liver NEFA concentrations (Wako

Chemicals GmbH[®], Neuss, Germany). TCOL and TG levels were assayed using commercials kits (Labtest[®], Belo Horizonte, Brazil), following the manufacturers' instructions with adaptations for microplate. All measurements were performed using a TECAN[®] Infinite 200 PRO plate reader (Männedorf, Switzerland).

Adipose tissue histological analysis

Small fragments of adipose tissue (WAT) were fixed in 4% buffered formaldehyde, embedded in paraffin and sectioned at 3µm. Adipose tissue was stained with hematoxylin and eosin (H&E) in order to determine the adipocyte diameter. The sections from each animal were histologically examined in light microscope (Biorevo[®] BZ-9000; Keyence, Itasca, Germany), photographed and analyzed.

Real time quantitative PCR

Total RNA was isolated from WAT and muscle tissues by using trizol (TRizol[®] Reagent, Darmstadt, Germany) and cleaned (RNeasy Mini kit, Qiagem, Hilden, Germany). RNA was quantified by using spectrophotometry (NanoDrop[®], München, Germany) and 1 µg was used to the synthesis of cDNA (Reverse Transcriptase – Invitrogen[®]) performed using M-MLV (S1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad[®] München, Germany). The reaction product was amplified using the GoTaq qPCR Master Mix (Promega[®]; Mannheim, Germany) by real time quantitative PCR (ABI 7900HT Real-Time PCR System-Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). mRNA was quantified as a relative value compared with an internal reference, GAPDH. The expression levels were obtained from the cycle threshold (Ct) associated with the exponential growth of the PCR products. Quantitative values for mRNA expression were obtained

by the parameter $2^{-\Delta\Delta Ct}$, in which ΔCt represented the subtraction of the *GAPDH* Ct values from the others. Primers used for real time quantitative PCR (amplicons between 100 - 150 bp) are as follows in Table 1.

Table 1. Primer sequences used for real time quantitative PCR.

Primers	Sequence Forward and Reverse (5' – 3')
<i>Leptin</i>	F: CGTGTGTGAAATGTCATTGATCCT R: GACACCAAAACCCTCATCAAGAC
<i>Adiponectin</i>	F: GGAACTTGTGCAGGTTGGAT R: CCTTCAGCTCCTGTCAATTCC
<i>LPL</i>	F: AGTGGCCGAGAGCGAGAAC R: CCACCTCCGTGAAATCAAGAAG
<i>HSL</i>	F: ACGGATACCGTAGTTGGTGC R: TCCAGAAGTGCACATCCAGGT
<i>Adrβ3</i>	F: GCTGACTTGGTAGTGGGACTC R: TAGAAGGGAGACGGAGGAGGAG
<i>GLUT4</i>	F: TGATTCTGCTGCCCTCTGT R: GGACATTGGACGCTCTCTCT
<i>IR</i>	F: CCACCAATACGTCAATTACAAC R: GGGCAGATGTCACAGAAATCAA
<i>GAPDH</i>	F: CCATCACCATCTTCCAGGAG R: GTGGTTCACACCCATCACAA

Legend: *LPL*: Lipoprotein lipase, *HSL*: Hormone-sensitive lipase, *Adr β 3*: Adrenergic β 3 receptor, *GLUT4*: Glucose transporter type 4, *IR*: Insulin receptor, *GAPDH*: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses to compare multiple groups were performed by using one and two-way ANOVA followed by *Bonferroni* post-test. Student's *t*-test was performed for between-group comparisons when applicable (Graph pad Prism® 5.0, San Diego, CA, USA).

Grants

V.N.S. was supported by the Fellowship DAAD/CNPq/CAPES – Brazil (Process 246794/2012-7). L.A.R. received a Postdoctoral Fellowship from CNPq-Brazil (Grant 202139/2010-7).

Acknowledgments

We thank Sabine Grueger, Susanne da Costa Gonçalves and Prof Dr Mihail Todiras for their technical assistance in animal care, and Lucas José Sá da Fonseca and Iris Apostel-Krause for their assistance in the English correction of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LAR and VNS. Performed the experiments: VNS, LAR, FQ, and NA. Analyzed the data: VNS, LAR, FQ, VM. Interpreted results of experiments: VNS, LAR, and FQ. Contributed with reagents/materials/animals/analysis tools: JMP, MB, NA, RASS and LAR. Wrote the paper: VNS and LAR. Prepared figures: VNS, LAR and FQ. Edited and revised manuscript: LAR, MB, and NA.

REFERENCES

1. Santos, R.A., Castro, C.H., Gava, E., Pinheiro, S.V., Almeida, A.P., Paula, R.D., Cruz, J.S., Ramos, A.S., Rosa, K.T., Irigoyen, M.C., et al. 2006. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 47:996-1002.
2. Rentzsch, B., Todiras, M., Iliescu, R., Popova, E., Campos, L.A., Oliveira, M.L., Baltatu, O.C., Santos, R.A., and Bader, M. 2008. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension* 52:967-973.
3. Santos, S.H., Braga, J.F., Mario, E.G., Porto, L.C., Rodrigues-Machado Mda, G., Murari, A., Botion, L.M., Alenina, N., Bader, M., and Santos, R.A. 2010. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:953-961.
4. Rabelo, L.A., Xu, P., Todiras, M., Sampaio, W.O., Buttgereit, J., Bader, M., Santos, R.A., and Alenina, N. 2008. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Hypertension* 2:418-424.
5. Xu, P., Costa-Goncalves, A.C., Todiras, M., Rabelo, L.A., Sampaio, W.O., Moura, M.M., Santos, S.S., Luft, F.C., Bader, M., Gross, V., et al. 2008. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension* 51:574-580.
6. Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.L., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., and Smith, S.C., Jr. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120:1640-1645.
7. Mahmood, I.H., Abed, M.N., and Merkhan, M.M. 2013. Effects of blocking of angiotensin system on the prevalence of metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. *Pakistan journal of medical sciences* 29:140-143.
8. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., et al. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research* 87:E1-9.
9. Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A.J. 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* 275:33238-33243.
10. Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., et al. 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417:822-828.

11. Rabelo, L.A., Alenina, N., and Bader, M. 2011. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res* 34:154-160.
12. Zhong, J., Basu, R., Guo, D., Chow, F.L., Byrns, S., Schuster, M., Loibner, H., Wang, X.H., Penninger, J.M., Kassiri, Z., et al. 2010. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation* 122:717-728, 718 p following 728.
13. Silva, A.R., Aguilar, E.C., Alvarez-Leite, J.I., da Silva, R.F., Arantes, R.M., Bader, M., Alenina, N., Pelli, G., Lenglet, S., Galan, K., et al. 2013. Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 305:R1323-1330.
14. Feltenberger, J.D., Andrade, J.M., Paraiso, A., Barros, L.O., Filho, A.B., Sinisterra, R.D., Sousa, F.B., Guimaraes, A.L., de Paula, A.M., Campagnole-Santos, M.J., et al. 2013. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension* 62:324-330.
15. Sahara, M., Ikutomi, M., Morita, T., Minami, Y., Nakajima, T., Hirata, Y., Nagai, R., and Sata, M. 2013. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 promotes the development of atherosclerosis and arterial neointima formation. *Cardiovascular research*.
16. Hashimoto, T., Perlot, T., Rehman, A., Trichereau, J., Ishiguro, H., Paolino, M., Sigl, V., Hanada, T., Hanada, R., Lipinski, S., et al. 2012. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 487:477-481.
17. Singer, D., Camargo, S.M., Ramadan, T., Schafer, M., Mariotta, L., Herzog, B., Huggel, K., Wolfer, D., Werner, S., Penninger, J.M., et al. 2012. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 303:G686-695.
18. Osterreicher, C.H., Taura, K., De Minicis, S., Seki, E., Penz-Osterreicher, M., Kodama, Y., Kluwe, J., Schuster, M., Oudit, G.Y., Penninger, J.M., et al. 2009. Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. *Hepatology* 50:929-938.
19. Verma, A., Shan, Z., Lei, B., Yuan, L., Liu, X., Nakagawa, T., Grant, M.B., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W., Raizada, M.K., et al. 2012. ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20:28-36.
20. Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., et al. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112-116.
21. Rabelo, L.A.s., Todiras, M., Nunes-Souza, V., Santos, R.A., Bader, M., and Alenina, N. 2014.
22. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Jiang, C., and Penninger, J.M. 2006. Lessons from SARS: control of acute lung failure by the SARS receptor ACE2. *Journal of molecular medicine* 84:814-820.

23. Patel, V.B., Bodiga, S., Basu, R., Das, S.K., Wang, W., Wang, Z., Lo, J., Grant, M.B., Zhong, J., Kassiri, Z., et al. 2012. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: a critical role of the angiotensin II/AT1 receptor axis. *Circulation research* 110:1322-1335.
24. Oudit, G.Y., Liu, G.C., Zhong, J., Basu, R., Chow, F.L., Zhou, J., Loibner, H., Janzek, E., Schuster, M., Penninger, J.M., et al. 2010. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes* 59:529-538.
25. Jayasooriya, A.P., Mathai, M.L., Walker, L.L., Begg, D.P., Denton, D.A., Cameron-Smith, D., Egan, G.F., McKinley, M.J., Rodger, P.D., Sinclair, A.J., et al. 2008. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:6531-6536.
26. Takeda, M., Yamamoto, K., Takemura, Y., Takeshita, H., Hongyo, K., Kawai, T., Hanasaki-Yamamoto, H., Oguro, R., Takami, Y., Tatara, Y., et al. 2013. Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. *Diabetes* 62:223-233.
27. Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H., and Quon, M.J. 2008. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance *in vivo*: advantages, limitations, and appropriate usage. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 294:E15-26.
28. Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine* 8:731-737.
29. Combs, T.P., Pajvani, U.B., Berg, A.H., Lin, Y., Jelicks, L.A., Laplante, M., Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Parlow, A.F., Cheeseboro, L., et al. 2004. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 145:367-383.
30. Bailey-Downs, L.C., Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Sonntag, W.E., Csiszar, A., and Ungvari, Z. 2013. Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68:780-792.
31. Adiels, M., Taskinen, M.R., and Boren, J. 2008. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Current Diabetes Reports* 8:60-64.
32. Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Pettiti, M., Matsuda, M., Mahankali, S., Santini, E., DeFronzo, R.A., and Ferrannini, E. 2002. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:5098-5103.

Table 2. Metabolic parameters in plasma, food intake and energy expenditure of C57Bl/6 and ACE2^{-/-} mice at the age of 3, 6 and 12 months under SD and HFD.

Parameters	3 Months		6 Months				12 Months			
	Standard diet		Standard diet		High fat diet		Standard diet		High fat diet	
	C57Bl/6	ACE2 ^{-/-}	C57Bl/6	ACE2 ^{-/-}	C57Bl/6	ACE2 ^{-/-}	C57Bl/6	ACE2 ^{-/-}	C57Bl/6	ACE2 ^{-/-}
Triglyceride (mg.dL ⁻¹)	36.7±5.7	27.4±5.1	22.1±1.3	16.3±0.6 ^{a,b}	26.9±2.2	29.0±1.7	33.9±3.3	32.9±7.4	45.8±6.0	44.9±3.9
Cholesterol (mg.dL ⁻¹)	63.6±2.7	46.8±2.7 ^a	70.3±4.1 ^c	55.5±4.9 ^{a,b}	126.3±4.7	140.7±10.2	68.1±5.7 ^c	73.3±12.6 ^b	173.6±11.1	210.3±27.6
NEFA (mmol.L ⁻¹)	0.33±0.06	0.19±0.03 ^a	0.55±0.05	0.38±0.03 ^a	0.49±0.05	0.49±0.05	0.48±0.09	0.27±0.07 ^a	0.42±0.04	0.42±0.09
Glucose (mg.dL ⁻¹)	111.6±5.9	111.0±9.4	121.6±8.8 ^c	103.5±7.0 ^b	153.0±9.3	165.2±7.8	138.8±9.0 ^c	130.6±6.6 ^b	187.8±6.7	176.8±6.9
Insulin (ng.mL ⁻¹)	161.8±7.0	161.2±7.0	179.2±12.2	175.7±4.9	238.7±25.8	184.1±4.4 ^d	303.5±6.8	301.2±9.2	333.0±17.5	331.1±17.3
Food intake (g)	2.38±1.3	2.35±1.5	2.55±1.5	1.92±0.69 ^a	2.29±1.31	1.67±0.39 ^d	ND	ND	ND	ND
Liquid intake (g)	1.99±1.5	1.80±1.4	1.48±0.9	2.08±1.2 ^a	1.30±0.83	2.34±0.65 ^a	ND	ND	ND	ND
Energy expenditure (kcal/h)	0.48±0.06	0.51±0.06 ^a	0.55±0.06	0.49±0.05 ^a	0.58±0.05	0.48±0.03 ^d	ND	ND	ND	ND

Each value represents the mean ± SEM. ANOVA (one way).

^ap<0.05 ACE2^{-/-} SD vs C57Bl/6 SD.

^bp<0.05 ACE2^{-/-} SD vs ACE2^{-/-} HFD.

^cp<0.05 C57Bl/6 SD vs C57Bl/6 HFD.

^dp<0.05 ACE2^{-/-} HFD vs C57Bl/6 HFD.

ND: not defined

Figure 1. (A) Body Weight; (B) Total fat; (C) White adipose tissue (WAT) index of C57Bl/6 and ACE2^{-/-} mice at the age of 3, 6 and 12 months under SD and HFD; and (D) white adipocyte diameter of C57Bl/6 and ACE2^{-/-} mice at the age of 6 months under SD and HFD. Each bar graph represents the mean ± SEM. ANOVA (one way): *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 KO vs WT.

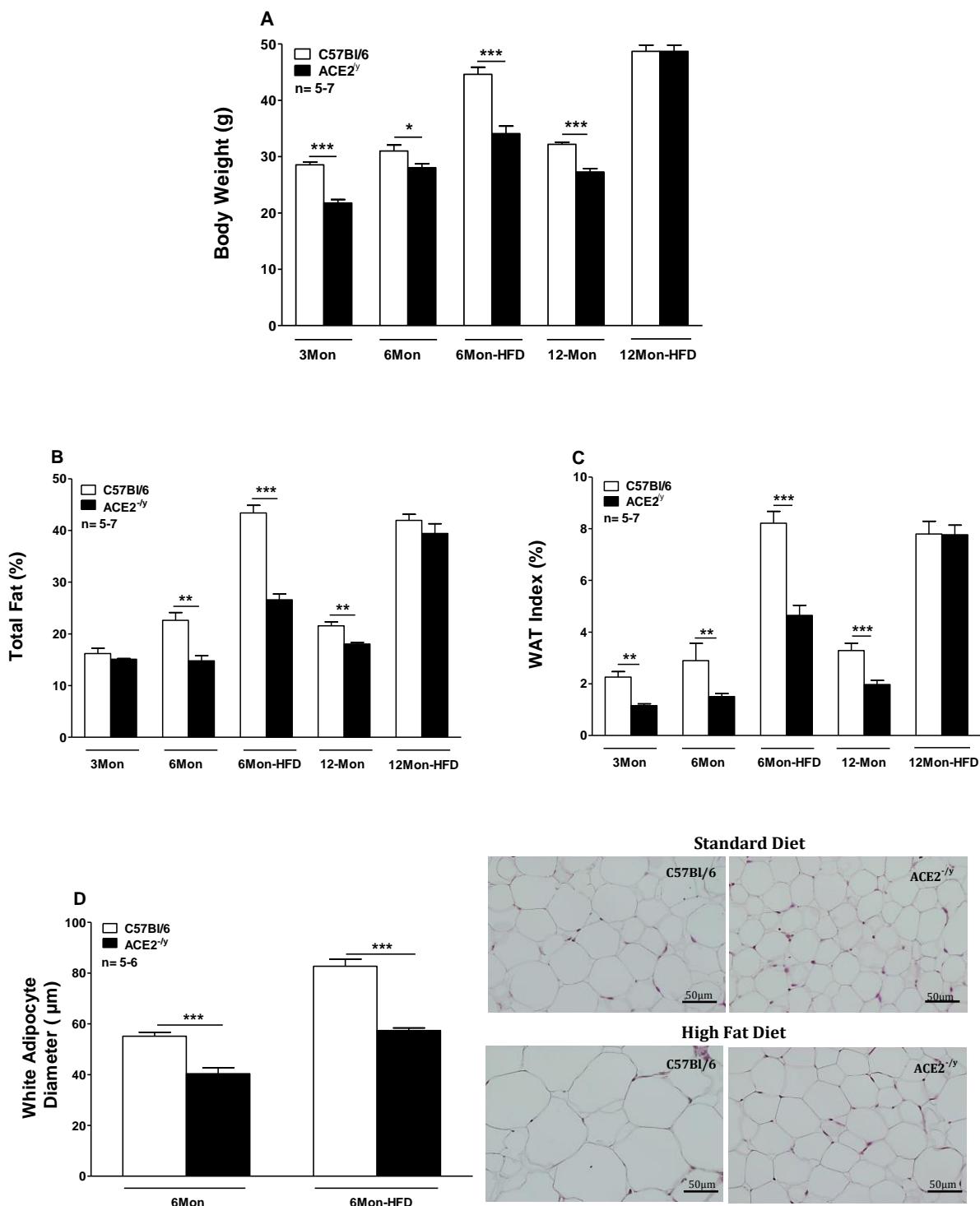
Figure 2. (A) Lipolysis *in vivo*; (B) Lipolysis *in vitro*; (C, D, E and F) Levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TCOL), non-esterified fatty acids (NEFA) and adiponectin, respectively evaluated during lipolysis *in vivo*; (G) Relative expression of lipoprotein lipase (*LPL*) in WAT; (H) Relative expression of *Adrβ3* receptor in WAT; (I) Relative expression of *HSL* in white adipose tissue (WAT); (J) Relative expression of *Adiponectin* in WAT (K) Adiponectin levels in plasma; (L) Relative expression of *Leptin* in WAT; (M) Leptin levels in plasma of C57Bl/6 and ACE2^{-/-} mice at the age of 6 and 12 months under SD and HFD. Each point on the graph represents the mean ± SEM. ANOVA (two ways): **p<0.01; ***p<0.001 KO vs WT. Each bar graph represents the mean ± SEM. ANOVA (one way): *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 KO vs WT.

Figure 3. Glucose Tolerance and area under the curve (AUC) of C57Bl/6 and ACE2^{-/-} mice at the age of 3 (A), 6 (B) and 12 (C) months under ND and HFD. Insulin Tolerance and AUC of C57Bl/6 and ACE2^{-/-} mice at the age of 3 (D), 6 (E) and 12 (F) months under SD and HFD. (G and H) Insulin receptor (*IR*) mRNA expression in white adipose tissue (WAT) and Muscle, respectively, and (I and J) Glucose transporter type 4 (*GLUT4*) mRNA expression in WAT and Muscle, respectively in 6-month-old animals under SD and HFD. Each point on the graph represents the mean ± SEM. ANOVA (two ways): *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 KO vs WT. Each

bar graph represents the mean \pm SEM. ANOVA (one way): * $p<0.05$; ** $p<0.01$; KO vs WT.

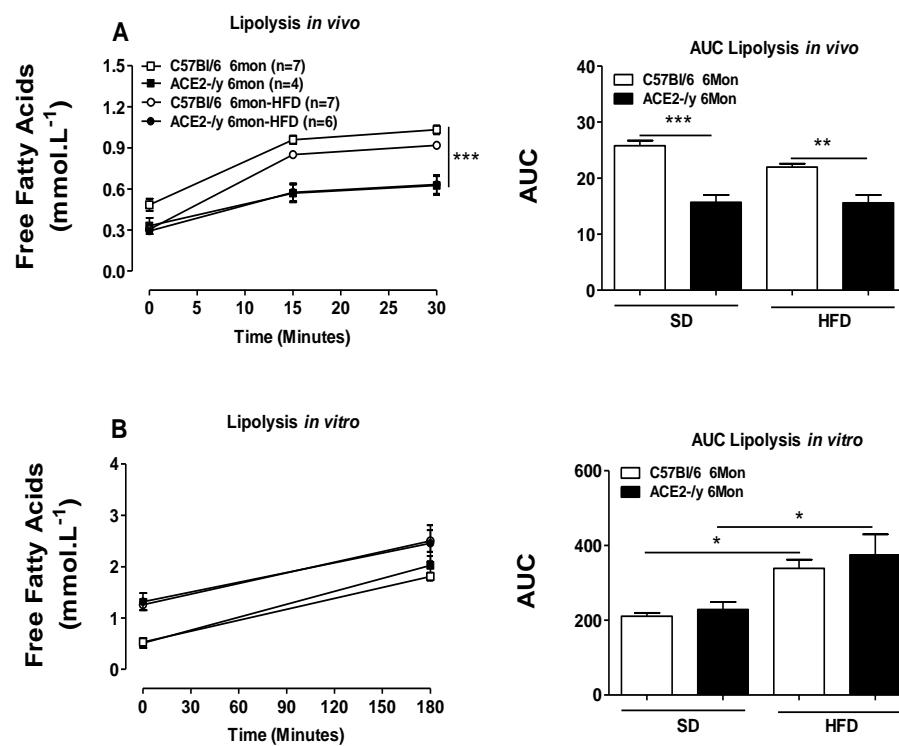
Figures

Figure 1



Nunes-Souza et al.

Figure 2



Evaluations during lipolysis *in vivo*

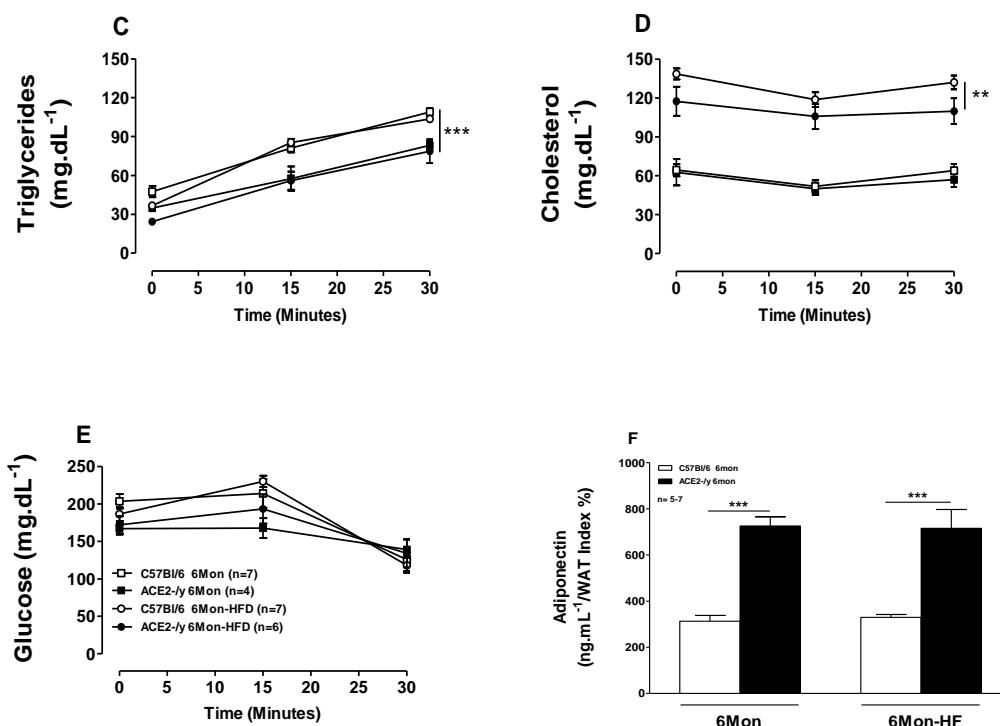


Figure 2

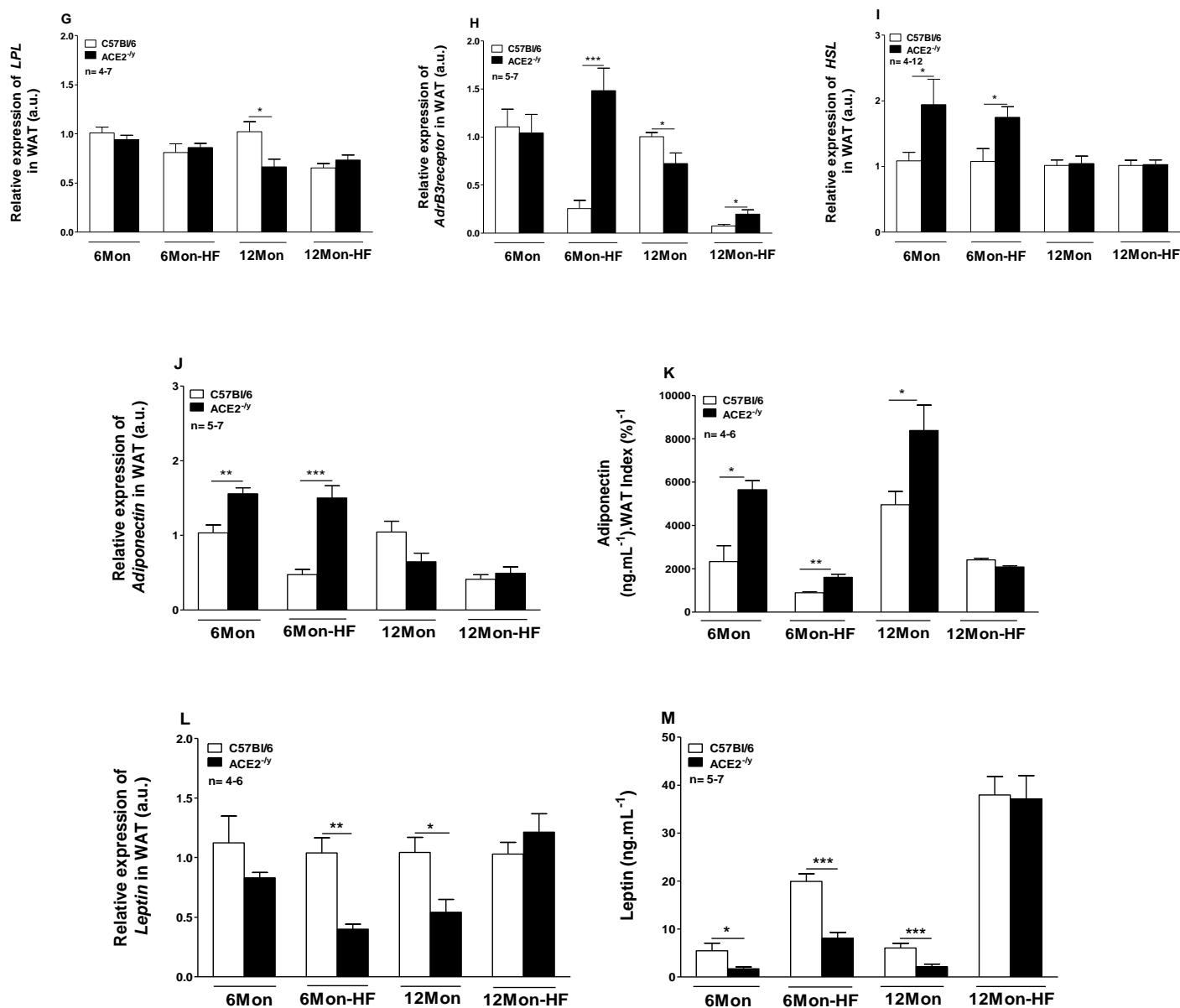


Figure 3

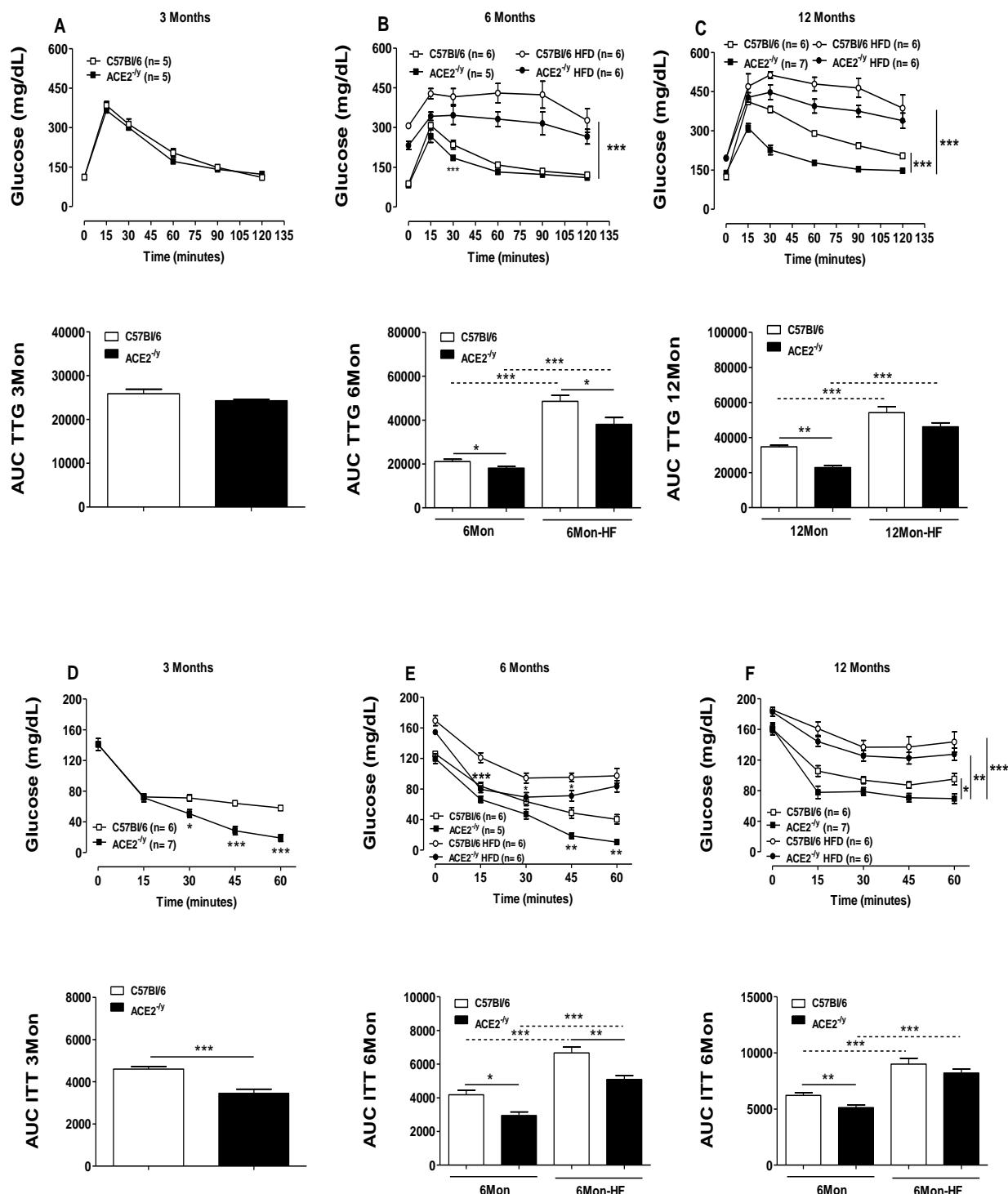
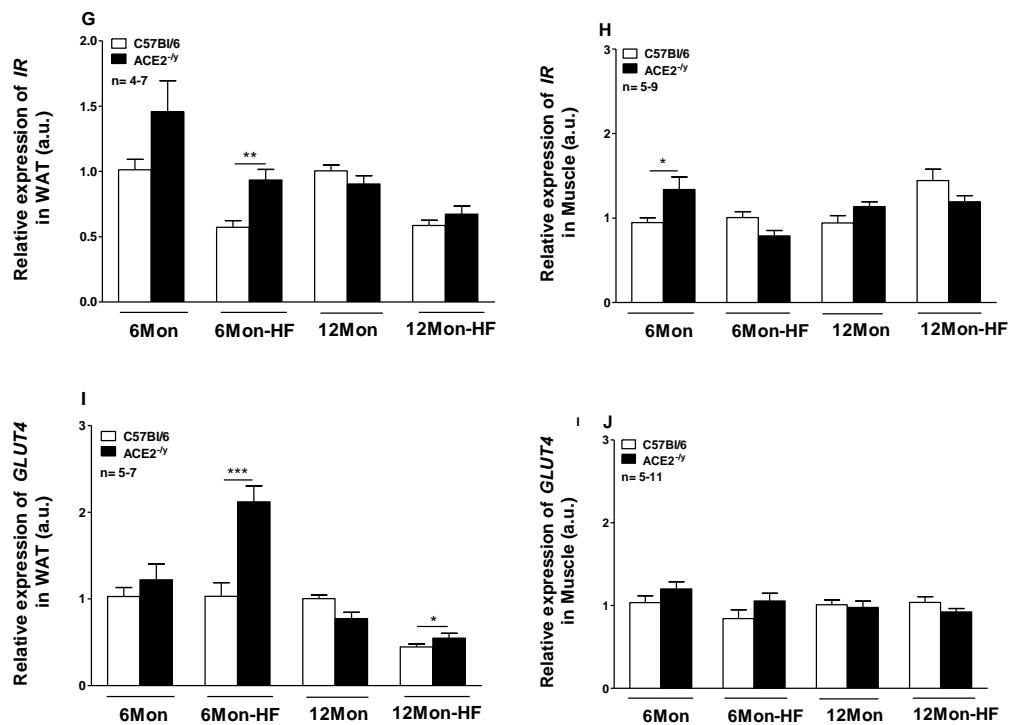


Figure 3



4.2 Artigo derivado da Tese: “Genetic deletion of ACE2 induces hepatic steatosis in mice”

Artigo submetido ao periódico *Diabetes, Obesity and Metabolism: a journal of pharmacology and therapeutics*

Endereço eletrônico do periódico:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1463-1326](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1463-1326)



Genetic deletion of ACE2 induces hepatic steatosis in mice

Journal:	<i>Diabetes, Obesity and Metabolism</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Nunes-Souza, Valéria; Federal University of Alagoas, Alenina, Natalia; Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Qadri, Fatimunnisa; Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Penninger, Josef; Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Santos, Robson; Federal University of Minas Gerais, Bader, Michael; Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Rabelo, Luiza; Federal University of Alagoas, Physiology and Pharmacology
Key Words:	adipose tissue

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

Genetic deletion of ACE2 induces hepatic steatosis in mice

Nunes-Souza, V.^{1,2,3}, Alenina, N.^{1,3,4*}, Qadri, F.¹, Penninger, J.M.⁵, Santos, R.A.S.^{3,4}, Bader, M.^{1,3,4,6,7},
Rabelo, L.A.^{1,2,3*}

¹Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin/Germany.

²Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC), Setor de Fisiologia e Farmacologia, ICBS,
Universidade Federal de Alagoas. Maceió, Al, Brazil.

³National Institute of Science and Technology in NanoBiopharmaceutics (N-BIOFAR), Brazil.

⁴Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁵Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria.

⁶Charité – University Medicine Berlin, Germany.

⁷Institute for Biology, University of Lübeck, Germany.

Running Head

ACE2 deletion induces steatosis

Key words: ACE2 knockout mice, renin angiotensin system, steatosis.

Word count: 3.159

Number of figures: 05

*Corresponding authors:

Prof. Dr. Luíza A. Rabelo

Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, CEP: 57072-900, Maceió, AL, Brazil.

Phone: +55 82 3214-1095

Fax: +55 82 3221-2501

Email: luizaa.rabelo@gmail.com

1
2
3
4 Dr. Natalia Alenina
5
6 Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine
7
8 Robert-Rössle-Str. 10
9
10 13125, Berlin, Germany
11
12 Tel: +493094063576
13
14 Fax: +493094062110
15
16 Email: alenina@mdc-berlin.de

For Review Only

1
2
3
4 **Abstract**
5
6

7 **Context & Aims:** Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) regulates the relative abundance of
8 angiotensin peptides and, therefore, represents an important component of the renin-angiotensin
9 system. Since angiotensin peptides have been shown to be involved in hepatic steatosis, we aimed to
10 evaluate the hepatic lipid profile in ACE2-deficient ($ACE2^{-/-}$) mice. **Methods:** Male C57BL/6 and
11 $ACE2^{-/-}$ mice were analyzed at the age of 3 and 6 months for alterations in the lipid profiles of blood
12 and liver and for hepatic steatosis. **Results:** $ACE2^{-/-}$ mice showed lower body weight and white
13 adipose tissue at all ages investigated. Moreover, these mice had lower levels of total cholesterol,
14 triglycerides, and non-esterified fatty acids in plasma. Strikingly, $ACE2^{-/-}$ mice showed high
15 deposition of lipids in the liver. Concurrently, these mice exhibited an increase in hepatic oxidative
16 stress, evidenced by increased lipid peroxidation and mRNA and protein expression for Uncoupling
17 protein 2 (UCP2), and downregulation of sirtuin1. $ACE2^{-/-}$ mice also showed impairments in glucose
18 metabolism and insulin signaling in the liver. **Conclusions:** We demonstrate here for the first time
19 that deletion of ACE2 interferes with lipid homeostasis, leading to lipodystrophy and steatosis.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a metabolic disorder of increasing clinical importance with different pathological presentations varying from initial hepatic steatosis, through non-alcoholic steatohepatitis, to fibrosis and cirrhosis, has been considered a novel component of the metabolic syndrome (MetS) [1, 2]. MetS is characterized by a cluster of cardiovascular and metabolic disorders, including central obesity, insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidemia, and hypertension [1, 2]. The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in the pathogenesis of MetS and NAFLD. The “classical arm” (angiotensin converting enzyme/angiotensin II/AT1 receptor [ACE/AngII/AT1]) promotes the disease, whereas the “protective arm” (angiotensin converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor [ACE2/Ang-(1-7)/Mas]) counteracts it [1, 2]. Of particular importance in the balance between the classical and the protective arm of the RAS is ACE2, an enzyme which hydrolyzes a vasoconstrictor/pro-inflammatory molecule, AngII, into a vasodilator/anti-inflammatory peptide, Ang-(1-7) [1].

Metabolic studies demonstrated an important role of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas pathway in the maintenance of homeostasis [3, 4]. Mice deficient for Mas presented dyslipidemia and hyperglycemia [5, 6]. Moreover, rats overexpressing Ang-(1-7) showed an improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity, and also exhibited decreased triglycerides, cholesterol and abdominal fat mass [7-9]. Treatment of diabetic rats with an oral formulation of Ang-(1-7) resulted in drastic reductions in glycemia and an increase in insulin sensitivity [10]. The genetic deletion of ACE2 leads to endothelial dysfunction and redox imbalance in mice (Rabelo et al. unpublished data), also implying insulin resistance under high fat conditions [11]. Interestingly, ACE2 is not only a protease which metabolizes peptides, such as AngII, apelin, and des-Arg9 bradykinin [12], but is also involved in the resorption of large amino acids from the gut [13, 14]. Accordingly, ACE2 deletion leads to defects in amino acid uptake and intestinal inflammation, but effects on lipid metabolism have not yet been reported.

1
2
3
4 AngII has been shown to cause NAFLD [15], whereas Ang-(1-7) elicits opposite effects [16,
5
6 17]. Accordingly, both, ACE inhibitors and AT1 antagonists protect from fatty liver and fibrosis [18],
7
8 and recombinant ACE2 has beneficial effects on liver fibrosis under diabetic conditions in mice [8].
9

10 Reactive oxygen species (ROS) are crucial mediators of angiotensin peptide actions, since
11 AngII promotes their generation and Ang-(1-7) reduces oxidative stress [19]. ROS are chronically
12 elevated in NAFLD and contribute to the pathogenesis of the disease [20]. However, it is still
13 unknown whether ACE2 plays a role in this liver disorder. Taking in consideration the important role
14 of angiotensins and ROS in the development of NAFLD, we aimed to investigate the hepatic lipid
15 profile in ACE2-deficient mice in which the relative abundance of AngII and Ang-(1-7) is distorted.
16 Indeed, we found that the deletion of ACE2 causes, besides hepatic steatosis, impairment in insulin
17 signaling and glucose metabolism in the liver.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 **METHODS**
5
6
7
8

9 ***Animals and experimental procedures***

10 C57BL/6 (WT) and ACE2-deficient (ACE2^{-/-}) male mice on C57BL/6 genetic background [4]
11 at 3 and 6 months of age were used in this study. All experiments were performed in accordance with
12 the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 86–23, 1996). The mice
13 were kept in a 12-hour light/dark cycle, with controlled humidity and temperature environment and
14 fed *ad libitum*.
15
16
17
18
19

20 ***Euthanasia and organ collection***
21
22
23
24
25

26 After intraperitoneal (i.p) anesthesia using a xylazine/ketamine solution (10/110, mg.kg⁻¹), the
27 animals were sacrificed by exsanguination through cardiac puncture of the right ventricle. The whole
28 blood was collected, centrifuged (4,000rpm for 10 min), and the plasma was separated and stored at -
29 80°C until biochemical analyses were performed. The animals were perfused with heparinized saline
30 and, in sequence, the liver and white adipose tissue (WAT) were carefully removed, weighed,
31 immediately frozen in dry ice and stored at -80°C until quantitative PCR, western blot and the other
32 analyses were performed. WAT index was calculated using the following formula: WAT index (%) =
33 {(Epididymal fat + Perirenal fat)/(Body Weight)}*100.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 ***Biochemical analyses***
47
48

49 A Wako NEFA kit was used to measure plasma and liver NEFA concentrations (Wako
50 Chemicals GmbH®, Neuss, Germany). The total cholesterol (TCOL) and triglycerides (TG) levels
51 were assayed with commercials kits (Labtest®, Belo Horizonte, Brazil), following the manufacturers'
52 instructions with adaptations for microplates. All measurements were performed with a TECAN®
53 Infinite 200 PRO plate reader (Männedorf, Switzerland).
54
55
56

57 ***Evaluation of liver injury***
58
59
60

Liver injury (the degree of hepatocellular damage) was assessed by measuring the enzymatic activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in plasma with commercial kits (Labtest®, Belo Horizonte, Brazil).

Liver and fecal lipids analysis

The total hepatic and fecal lipids were extracted according to a gravimetric standard method [21]. Total lipids were measured by weighing the samples on an analytical balance after extraction, being normalized by the mass of faeces used for extraction. After this, the total lipids were diluted in isopropanol and measured by commercial kits for TCOL, TG (Labtest®, Belo Horizonte, Brazil), and NEFA (Wako Chemicals GmbH®, Neuss, Germany).

Liver and WAT histological analysis

Small fragments of liver and WAT were fixed in 4% buffered formaldehyde, embedded in paraffin and sectioned at 3 μ m and 10 μ m, respectively. WAT was stained with H&E in order to determine adipocyte diameters. The lipid deposition in the liver was analyzed indirectly by immunofluorescence staining for adipophilin. In brief, sections were deparaffinized, rehydrated and boiled in citrate buffer, pH 7, for 20 min in a vegetable steamer. The sections were incubated with an antibody against adipophilin (1:500, Fitzgerald, Acton USA) overnight at 4°C. The sections were then incubated with a secondary antibody conjugated with Cy3 (1:300) and coverslipped using the mounting medium “Vectashield with DAPI-Hard set” (Vector Lab). The sections were observed under a Keyence® microscope (BZ 9000, Osaka, Japan). Digital photographs were taken from each section, adipocyte diameter and adipophilin expression were quantified using the “BZ II Analyzer” image processing software (Keyence BZ 9000 Software, Osaka, Japan).

Lipid peroxidation measurement in the liver

The hepatic lipid peroxidation was quantified by measuring the ThioBarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS), a marker of oxidative stress which was assayed by malondialdehyde (MDA) in

1
2
3
4 liver homogenates as described [22]. Absorbance was read at 532 nm (TECAN® Infinite 200 PRO
5 plate reader, Männedorf, Switzerland) and normalized to protein concentration [23].
6
7
8
9

10 **Gluconeogenesis**
11
12

13 Gluconeogenesis was evaluated by the pyruvate test. It was performed after 16 hours
14 overnight fast. The animals were weighed and blood was collected from the tail vein for measuring
15 glucose before the injection of 2g sodium pyruvate.kg⁻¹ (i.p) (Sodium Pyruvate, Sigma-Aldrich®,
16 Seelze, Germany). After injection, the glucose levels were measured at 15, 30, 60, 90, and 120
17 minutes.
18
19
20
21
22

23 **Real time quantitative PCR**
24
25

26 Total RNA was isolated from liver using Trizol (TRizol® Reagent, Invitrogen, Darmstadt,
27 Germany) and subsequently cleaned using RNeasy Mini kit (Qiagem, Hilden, Germany). RNA
28 concentration was quantified using spectrophotometry (NanoDrop®, München, Germany) and 1 µg
29 was taken for the synthesis of cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). The reaction
30 product was amplified using the GoTaq qPCR Master Mix (Promega®, Mannheim, Germany) by real
31 time quantitative PCR (ABI 7900HT Real-Time PCR System-Applied Biosystems, Darmstadt,
32 Germany) with gene-specific primers (Table 1). The mRNA expression level was quantified by
33 normalization to the internal reference, GAPDH, using the 2^{-ΔΔCt} method [24].
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **Western Blotting**
50
51

52 For Western blotting, proteins were isolated using a lysis buffer (Cell Signaling Technology®,
53 Beverly, MA) containing mammalian protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche®,
54 Mannheim, Germany), and quantified by Bradford assay [25]. The proteins were separated by
55 electrophoresis, transferred to a Polyvinylidene fluoride membrane, which was blocked by incubation
56 in Odyssey® blocking buffer (Li-COR®, Biosciences, Lincoln, USA) for 1h at room temperature (RT).
57 Thereafter, the membrane was probed (overnight, 4°C) with one of the following primary antibodies:
58
59
60

1
2
3
4 UCP2 (1:500), Sirtuin1 (1:1,000), α -IRS-1(1:1,000), PI3-K (1:500), AKT (1:1,000), phospho-GSK 3 β
5 (1:1,000) and GSK 3 β (1:1,000) followed by incubation with a secondary antibody for 1h at RT. Band
6 intensities were acquired and quantified using the Odyssey® infrared imaging system (Li-COR®,
7 Biosciences, Lincoln, USA). The membrane was stripped and re-probed with β -actin (1:1,000)
8 antibody to obtain an endogenous control for protein quantification.
9
10
11
12
13
14
15
16

17 Statistical analysis

18

19 Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Student's *t*-test was
20 performed for the between-group comparisons (Graph pad Prism® 5.0, San Diego, CA, USA). The
21 hepatic gluconeogenesis test was analyzed by two-way ANOVA followed by *Bonferroni's* post-test.
22
23 p<0.05 was considered statistically significant.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

ACE2 deficiency decreases body weight and changes the plasma lipid profile

To reveal the role of ACE2 in fat metabolism, we evaluated body (BW) and white adipose tissue (WAT) weight and plasma lipid profile in ACE2^{-/y} mice. These animals showed lower BW and WAT index at 3 and 6 months of age compared to WT mice (Figure 1A-B) and a decrease in white adipocyte diameter (Figure 1C). The reduction of BW and WAT index were accompanied by decreased lipids in plasma: in 3 and 6 month-old mice, the levels of NEFA in plasma were significantly lower, and at 6 months of age also TCOL and TG were reduced in ACE2^{-/y} mice compared to WT animals (Figure 1D-F).

ACE2 deficiency leads to hepatic steatosis and oxidative stress

As ACE2^{-/y} mice develop intestinal dysfunction [26], we investigated whether the missing plasma lipids were released to the faeces in 6-month-old mice. The results showed that there were no significant differences in total lipids, TCOL, TG, and NEFA levels between WT and ACE2^{-/y} mice (Figure 1G-J). However, when we investigated ectopic fat deposition, we identified lipid accumulation in the liver. Immunofluorescence staining for adipophilin, a lipid droplet-associated protein, showed a higher fat deposition in ACE2^{-/y} mice at 6 months of age compared to WT (Figure 2A-B). These data indicate that ACE2^{-/y} mice present a steatotic state.

We next quantified the liver lipids in ACE2^{-/y} mice. Although these animals showed no difference in relative liver weight (Figure 2C), they stored increased levels of TCOL, TG, and NEFA in the liver at the age of 3 months, and of TG and NEFA at the age of 6 months compared to WT (Figure 2D-F). Plasma ALT was significantly increased in ACE2^{-/y} mice at both ages (Figure 2G), and plasma AST was also significantly increased in 6 months old ACE2^{-/y} mice (Figure 2H), confirming liver injury in these animals.

Expression analysis of genes, involved in lipid metabolism in the liver showed that ACE2^{-/y} mice have significantly more mRNA for fatty acid translocase (CD36), but the levels of mRNA for

1
2
3
4 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), adipocyte protein 2 (aP2), and fatty acid
5 synthase (FAS) in the liver were not different between ACE2^{-/y} and WT mice (Figure 3).
6
7

8 ACE2^{-/y} mice showed increased hepatic lipid peroxidation at the age of 3, but not 6 months
9 (Figure 4A). In addition, the expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) was
10 significantly higher in ACE2^{-/y} mice compared to WT at mRNA (Figure 4B) and protein levels at both
11 ages (Figure 4C), suggesting that the steatosis is accompanied by oxidative stress. The levels of
12 sirtuin1 were significantly decreased in liver of 6 but not 3 months old ACE2^{-/y} mice compared to WT
13 (Figure 4D).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

ACE2 deficiency leads to impaired insulin signaling in the liver

25 As steatosis is often associated with insulin resistance [25], we investigated glucose
26 metabolism and insulin signaling in the liver of ACE2^{-/y} mice. The liver of ACE2^{-/y} mice showed
27 severe impairment in insulin signaling and glucose handling. Whereas the hepatic capacity of glucose
28 production from pyruvate was not altered in these mice (Figure 5A), several genes involved in
29 glucose metabolism were dysregulated. ACE2^{-/y} mice presented a reduction in the relative expression
30 of glucokinase (GCK) and of glucose transporter type 2 (GLUT2), and increased levels of expression
31 of glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase subtype 2 (PCK2). The
32 other subtype, PCK1, and the insulin receptor were however not differentially expressed between the
33 groups (Figure 5B). Moreover, ACE2^{-/y} mice presented a significant decrease in proteins involved in
34 glycolysis, such as insulin receptor substrate-1 (α IRS-1), phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3-K) and
35 AKT compared to WT (Figure 5C-E). Furthermore, GSK 3 β and phosphorylated GSK 3 β were
36 decreased in ACE2^{-/y} mice (Figure 5F-G). However, GSK 3 β /phosphorylated GSK 3 β ratio was not
37 different between groups (Figure 5H).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

DISCUSSION

53
54
55
56 The major findings of the present study are that the deletion of ACE2 causes paradoxical
57 metabolic effects: on the one hand, it results in a markedly diminished BW and WAT. On the other
58

hand, it leads to the development of steatosis and insulin resistance in the liver. Evidence for this disorder includes an increased amount of adipophilin-containing vesicles in hepatocytes (Figure 2A-B), augmented lipids in the liver (Figure 2D-F), and an accumulation of liver enzymes in plasma as indication of liver injury (Figure 2G-H). The decrease of WAT index, adipocyte diameter (Figure 1B-C) and plasma lipids (Figure 1D-F) associated with the normal faecal lipid excretion (Figure 1G-J), suggested an increased uptake of fatty acids by the liver as primary cause for the NAFLD observed in ACE2^{-/-} mice. Indeed, CD36, the fatty acid translocase, is upregulated in mice lacking ACE2 (Figure 3). It has been shown that the upregulation of CD36 in the liver is associated with increased steatosis in NAFLD patients [16] and CD36^{-/-} mice are resistant to alcohol and high-carbohydrate-induced hepatic steatosis [27]. The increase in CD36 may be caused by the decreased expression of sirtuin1 in ACE2^{-/-} mice (Figure 4D), as it was observed in heterozygous sirtuin1-deficient mice [28-30]. In addition, Cao and collaborators [31] showed that the deletion of hepatocyte-specific menin causes steatosis in aging mice by decreasing the levels of sirtuin1 in the liver and upregulation of CD36. AngII has been shown to downregulate sirtuin1 in other cell types [32] and Ang-(1-7) exhibit the opposite effect in liver cells [33]. Thus, a downregulation of this translocase can be expected from the imbalance between the two peptides in ACE2^{-/-} mice. Interestingly, it has recently been shown that sirtuin1 can *vice versa* regulate ACE2 expression [34].

Increase in cytosolic fatty acids leads to mitochondrial damage and the production of reactive oxygen species (ROS) [35]. Moreover, hepatic sirtuin1 deficiency in mice induces oxidative liver damage [36]. Indeed, we observed increased lipid peroxidation and UCP2 expression as oxidative markers also in the liver of ACE2^{-/-} mice, suggesting that steatosis is accompanied by elevated oxidative stress in these animals. UCP2, a mitochondrial anion carrier protein, plays a key role as a moderator of ROS production during hepatic metabolism. Accordingly, UCP2^{-/-} mice showed increased ROS formation [37]. In ACE2^{-/-} mice, an increase in intracellular lipids in the liver may lead to a mitochondria overload, followed by an increase in ROS production during the β-oxidation of lipids, which in turn stimulates the expression of UCP2 to combat this imbalance. These data suggest that the increased expression of this uncoupling protein could be an - insufficient - defense

1
2
3
4 mechanism in the attempt to prevent the progression of steatosis in ACE2^{-/-} mice [38]. We cannot
5 exclude that AngII-induced oxidative stress may be a primary cause of liver steatosis in ACE2^{-/-}
6 mice, which is not compensated by Ang-(1-7) in these animals [39].
7
8

9 As already described in other mouse models and patients [40], the high lipid deposition in the
10 liver of ACE2^{-/-} mice resulted in impaired insulin signaling and glucose metabolism. Although these
11 animals showed normal glucose production from pyruvate, changes in the expression of important
12 genes for glucose metabolism, such as GCK, G6Pase, PCK2, and GLUT2, suggest that, as a result of
13 steatosis, glycolysis could be impaired. Furthermore, the decrease in IRS-1, PI3-K, AKT, and GSK3β
14 pathway confirms that insulin signaling is impaired in the liver of ACE2^{-/-} mice.
15
16

17 Experimental evidence indicates that RAS signaling plays a critical role in the metabolism of
18 fat in the liver. ACE-deficient mice show a pronounced increase in expression of key genes involved
19 in lipolysis and fatty acid oxidation in the liver, such as lipoprotein lipase, carnitine palmitoyl
20 transferase and long-chain acetyl CoA dehydrogenase. This suggests an increase in fatty acid
21 hydrolysis and β-oxidation, which could prevent an accumulation of lipids in the liver and might be
22 due to the absence of AngII in these knockout animals [41]. On the other hand, ACE2-deficient mice
23 have increased levels of AngII which is known to contribute to the development of steatosis and
24 insulin resistance [42]. AT1 receptor activation leads to steatosis via decreased UCP2 in a rat model
25 with metabolic syndrome [43], and the deletion of AT1 receptor reduces hepatic steatosis [41].
26 Moreover, it has been shown that the oral treatment with Ang-(1-7) prevents HFD-induced steatosis
27 [44], and that the deletion of Mas in ApoE-deficient mice leads to an increased hepatic lipid content
28 [45]. Taken together, this large body of experimental evidence and our results show that a balanced
29 activity of the two axes of the RAS, ACE/AngII/AT1 and ACE2/Ang-(1-7)/Mas, is essential to
30 metabolize fat for energy maintenance in the liver without inducing steatosis. ACE2 is the key
31 enzyme in this balance and maybe a central regulator of liver homeostasis since it is also upregulated
32 in cirrhosis in rats and humans [8].
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 The observed BW reduction in ACE2-deficient mice confirms the findings of Singer et al.
5 [7], who link it to the defective amino acid absorption in the gut of these animals. However, the
6 reduction in WAT by the mechanism described in our study may also contribute to this phenotype.
7
8
9

10 In sum, ACE2 deletion decreases sirtuin1 expression and increases CD36 expression, as well
11 fat deposition in the liver leading to NAFLD, oxidative stress, and impaired insulin signaling.
12 Therefore, ACE2-deficient mice provide a suitable model for assessing the pathophysiological
13 relevance of NAFLD and represent an excellent tool to investigate new therapeutic strategies for
14 MetS. It is important to note that this might or might not be an intrinsic feature of the RAS, since
15 ACE2 is a multifunctional enzyme, whose actions are not yet fully explored.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

ACKNOWLEDGMENTS

26
27 We thank Sabine Grueger and Susanne da Costa Gonçalves for their technical assistance in
28 animal care, Prof. Dr. Mihail Todiras for helpful discussions, and Lucas José Sá da Fonseca and Iris
29 Apostel-Krause for their assistance in the editing of the manuscript.
30
31
32
33
34
35
36

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

37
38 Conceived and designed the experiments: VNS, MB, and LAR. Performed the experiments: VNS,
39 NA, FQ, and LAR. Analyzed the data: VNS, FQ, and LAR. Interpreted the results of experiments:
40 VNS, FQ, and LAR. Contributed with reagents/materials/animals/analysis tools: JMP, MB, NA,
41 RASS, and LAR. Wrote the paper: VNS and LAR. Prepared figures: VNS, FQ, and LAR. Edited and
42 revised manuscript: LAR, MB, RAS, and NA.
43
44
45
46
47
48

FINANCIAL SUPPORT

49
50 VNS was supported by the Fellowship DAAD/CNPq/CAPES – Brazil (Process 246794/2012-7).
51
52 LAR received a Postdoctoral Fellowship from CNPq-Brazil (Grant 202139/2010-7). NA was
53 supported by CNPq (Grant BJT 407352), and RASS and NA were supported by DAAD-CAPES
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 exchange program PROBRAL. JMP was supported by an Advanced ERC grants and the Austrian
5
6 Academy of Sciences.
7
8
9

10 **DISCLOSURE STATEMENT**
11
12 The authors have declared that no conflict of interest exists.
13
14
15
16

17 **ABBREVIATIONS**
18
19

20 Angiotensin converting enzyme: ACE
21 Angiotensin converting enzyme 2: ACE2
22 Alanine aminotransferase: ALT
23 Angiotensin-(1-7): Ang-(1-7)
24 Angiotensin II: AngII
25 Adipocyte Protein 2 (fatty acid binding protein): aP2
26 Aspartate aminotransferase: AST
27 AT1 receptor: AT1
28 Body weight: BW
29 Cluster of Differentiation 36 (fatty acid translocase): CD36
30 Fatty Acid Synthase: FAS;
31 Glucose 6-phosphatase: G6Pase;
32 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH
33 Glucokinase: GCK
34 Glucose transporter type 2: GLUT2
35 Glycogen synthase kinase: GSK
36 Hematoxylin and eosin: H&E,
37 High fat diet: HFD
38 Insulin receptor: IR
39 Insulin receptor substrate: IRS
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 Malondialdehyde: MDA
5
6 Metabolic syndrome: MetS
7
8 Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD
9
10 Non-esterified fatty acids: NEFA
11
12 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1: PCK1
13
14 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2: PCK2
15
16 Phosphatidyl inositol-3 kinase: PI3-K
17
18 Peroxisome proliferator-activated receptor γ : PPAR γ
19
20
21 Renin-angiotensin system: RAS
22
23 Reactive oxygen species: ROS
24
25 ThioBarbituric Acid-Reactive Substances: TBARS
26
27 Total cholesterol: TCOL
28
29 Triglycerides: TG
30
31 Uncoupling protein 2: UCP2
32
33 White adipose tissue: WAT
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 REFERENCES
5

- [1] Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; **120**: 1640-1645
- [2] den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004; **24**: 644-649
- [3] Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010; **50**: 439-465
- [4] Rabelo LA, Alenina N, Bader M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res*. 2011; **34**: 154-160
- [5] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000; **87**: E1-9
- [6] Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 2000; **275**: 33238-33243
- [7] Silva AR, Aguilar EC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; **305**: R1323-1330
- [8] Feltenberger JD, Andrade JM, Paraiso A, et al. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension*. 2013; **62**: 324-330
- [9] Sahara M, Ikutomi M, Morita T, et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 promotes the development of atherosclerosis and arterial neointima formation. *Cardiovascular research*. 2013;
- [10] Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008; **57**: 340-347
- [11] Santos SH, Braga JF, Mario EG, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; **30**: 953-961
- [12] Santos SH, Giani JF, Burghi V, et al. Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med (Berl)*. 2014; **92**: 255-265
- [13] Takeda M, Yamamoto K, Takemura Y, et al. Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. *Diabetes*. 2013; **62**: 223-233
- [14] Chhabra KH, Chodavarapu H, Lazartigues E. Angiotensin converting enzyme 2: a new important player in the regulation of glycemia. *IUBMB Life*. 2013; **65**: 731-738
- [15] Vickers C, Hales P, Kaushik V, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*. 2002; **277**: 14838-14843

- [16] Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, *et al.* ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*. 2012; **487**: 477-481
- [17] Singer D, Camargo SM, Ramadan T, *et al.* Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012; **303**: G686-695
- [18] Wei Y, Clark SE, Morris EM, *et al.* Angiotensin II-induced non-alcoholic fatty liver disease is mediated by oxidative stress in transgenic TG(mRen2)27(Ren2) rats. *J Hepatol*. 2008; **49**: 417-428
- [19] Toblli JE, Munoz MC, Cao G, Mella J, Pereyra L, Mastai R. ACE inhibition and AT1 receptor blockade prevent fatty liver and fibrosis in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; **16**: 770-776
- [20] Osterreicher CH, Taura K, De Minicis S, *et al.* Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2009; **50**: 929-938
- [21] Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free radical research*. 2013; **47**: 869-880
- [22] Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002; **417**: 822-828
- [23] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1957; **226**: 497-509
- [24] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; **95**: 351-358
- [25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; **72**: 248-254
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; **25**: 402-408
- [27] Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014; **7**: 221-239
- [28] Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, *et al.* Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; **294**: G1281-1287
- [29] Sheedfar F, Sung MM, Aparicio-Vergara M, *et al.* Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany NY)*. 2014; **6**: 281-295
- [30] Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, *et al.* Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. 2011; **60**: 1394-1402
- [31] Clugston RD, Yuen JJ, Hu Y, *et al.* CD36-deficient mice are resistant to alcohol- and high-carbohydrate-induced hepatic steatosis. *J Lipid Res*. 2014; **55**: 239-246
- [32] Xu F, Gao Z, Zhang J, *et al.* Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1^{+/−} mice: a role of lipid mobilization and inflammation. *Endocrinology*. 2010; **151**: 2504-2514

- [33] Cao Y, Xue Y, Xue L, *et al.* Hepatic menin recruits SIRT1 to control liver steatosis through histone deacetylation. *J Hepatol.* 2013; **59**: 1299-1306
- [34] Kackstein K, Teren A, Matsumoto Y, *et al.* Impact of angiotensin II on skeletal muscle metabolism and function in mice: contribution of IGF-1, Sirtuin-1 and PGC-1alpha. *Acta Histochem.* 2013; **115**: 363-370
- [35] Andrade JM, Lemos FD, da Fonseca Pires S, *et al.* Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin-(1-7). *Peptides.* 2014; **60C**: 56-62
- [36] Clarke NE, Belyaev ND, Lambert DW, Turner AJ. Epigenetic regulation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) by SIRT1 under conditions of cell energy stress. *Clin Sci (Lond).* 2014; **126**: 507-516
- [37] Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free radical biology & medicine.* 2008; **44**: 1259-1272
- [38] Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CX. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation.* 2011; **121**: 4477-4490
- [39] Kuhla A, Hettwer C, Menger MD, Vollmar B. Oxidative stress-associated rise of hepatic protein glycation increases inflammatory liver injury in uncoupling protein-2 deficient mice. *Lab Invest.* 2010; **90**: 1189-1198
- [40] Zhou M, Xu A, Tam PK, *et al.* Upregulation of UCP2 by adiponectin: the involvement of mitochondrial superoxide and hnRNP K. *PLoS One.* 2012; **7**: e32349
- [41] Matthew Morris E, Fletcher JA, Thyfault JP, Rector RS. The role of angiotensin II in nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; **378**: 29-40
- [42] Besse-Patin A, Estall JL. An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. *Int J Cell Biol.* 2014; **2014**: 519153
- [43] Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, *et al.* Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008; **105**: 6531-6536
- [44] Montez P, Vazquez-Medina JP, Rodriguez R, *et al.* Angiotensin receptor blockade recovers hepatic UCP2 expression and aconitase and SDH activities and ameliorates hepatic oxidative damage in insulin resistant rats. *Endocrinology.* 2012; **153**: 5746-5759
- [45] Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2009; **50**: 1226-1235

1
2
3
4 **Legends**
5
6

7
8 **Figure 1. Body weight, WAT index and lipid profile in ACE2^{-/-} mice.** (A) Body Weight (g); (B)
9 WAT index (%) of WT and ACE2^{-/-} mice at the age of 3 and 6 months; (C) White adipocyte
10 diameter (μm); (D) Total cholesterol (mg.dL^{-1}), (E) Triglycerides, (mg.dL^{-1}), (F) Non-esterified fatty
11 acids (NEFA) (mmol.L^{-1}) in plasma of WT and ACE2^{-/-} mice at the age of 3 and 6 months; (G) Total
12 lipids (g.g^{-1} of faeces), (H) Total cholesterol (mg.g^{-1} of faeces), (I) Triglycerides (mg.g^{-1} of faeces),
13 (J) NEFA (mmol.g^{-1} of faeces) in faeces of WT and ACE2^{-/-} mice at the age of 6 months. Each bar
14 graph represents the mean \pm SEM.. Student's *t* test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Figure 2. Hepatic steatosis and liver function of ACE2^{-/-} mice** (A) Immunofluorescence staining
28 for adipophilin in the liver; (B) Adipophilin quantification (% area/view field); (C) Relative liver
29 weight (%); (D) Cholesterol in liver (mg.g^{-1} of liver); (E) Triglycerides in liver (mg.g^{-1} of liver); (F)
30 Non-esterified fatty acids (NEFA) in liver (mmol.g^{-1} of liver); (G) Alanine aminotransferase (ALT)
31 in plasma (U.L^{-1}); (H) Aspartate aminotransferase (AST) in plasma (U.L^{-1}) of WT and ACE2^{-/-} mice
32 at the age of 3 and 6 months. Each bar graph represents the mean \pm SEM. Student's *t* test: * $p<0.05$;
33 ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.
34
35
36
37
38
39
40
41

42
43
44 **Figure 3. Relative expression of genes involved in the lipolytic pathway in the liver** (fatty acid
45 translocase, CD36; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ ; adipocyte Protein 2,
46 aP2; and Fatty Acid Synthase, FAS) (arbitrary units) of C5WT and ACE2^{-/-} mice at the age of 6
47 months. Each bar graph represents the mean \pm SEM. Student's *t* test: ** $p<0.01$.
48
49
50
51
52

53
54
55 **Figure 4. Markers of redox and lipid state in liver** (A) Malondialdehyde (MDA) in liver (nM.mg
56 Protein $^{-1}$); (B) Relative mRNA and (C) protein expression of Uncoupling protein 2 (UCP2) in the
57 liver (arbitrary units); (D) Sirtuin1 protein expression in the liver (arbitrary units) of WT and ACE2^{-/-}
58
59
60

1
2
3
4 mice at the age of 3 and 6 months. Each bar graph represents the mean \pm SEM. Student's *t* test:
5
6 *p<0.05; ***p<0.001.
7
8
9

10
11 **Figure 5. Hepatic glucose metabolism** (A) Evaluation of hepatic gluconeogenesis stimulated by
12 intraperitoneal injection of pyruvate and Area Under the Curve of the test (AUC); . (B) Relative
13 expression of glycolytic genes in the liver (Glucokinase, GCK; Glucose 6-phosphatase, G6Pase;
14 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 and 2, PCK; Insulin receptor, IR; and Glucose transporter type
15 2, GLUT2) (arbitrary units); (C) α -Insulin Receptor Substrate-1 (α IRS) protein expression in the liver
16 (arbitrary units); (D) Phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3-K) protein expression in the liver (arbitrary
17 units); (E) AKT protein expression in the liver (arbitrary units); (F) Glycogen synthase kinase (GSK)
18 3 β in the liver (arbitrary units); (G) Phospho-GSK 3 β in the liver (arbitrary units); (H) GSK
19 3 β /Phospho-GSK 3 β in the liver (arbitrary units) of WT and ACE2^{-/-} mice at the age of 6 months.
20
21 Data are presented as mean \pm SEM. Student's *t* test: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

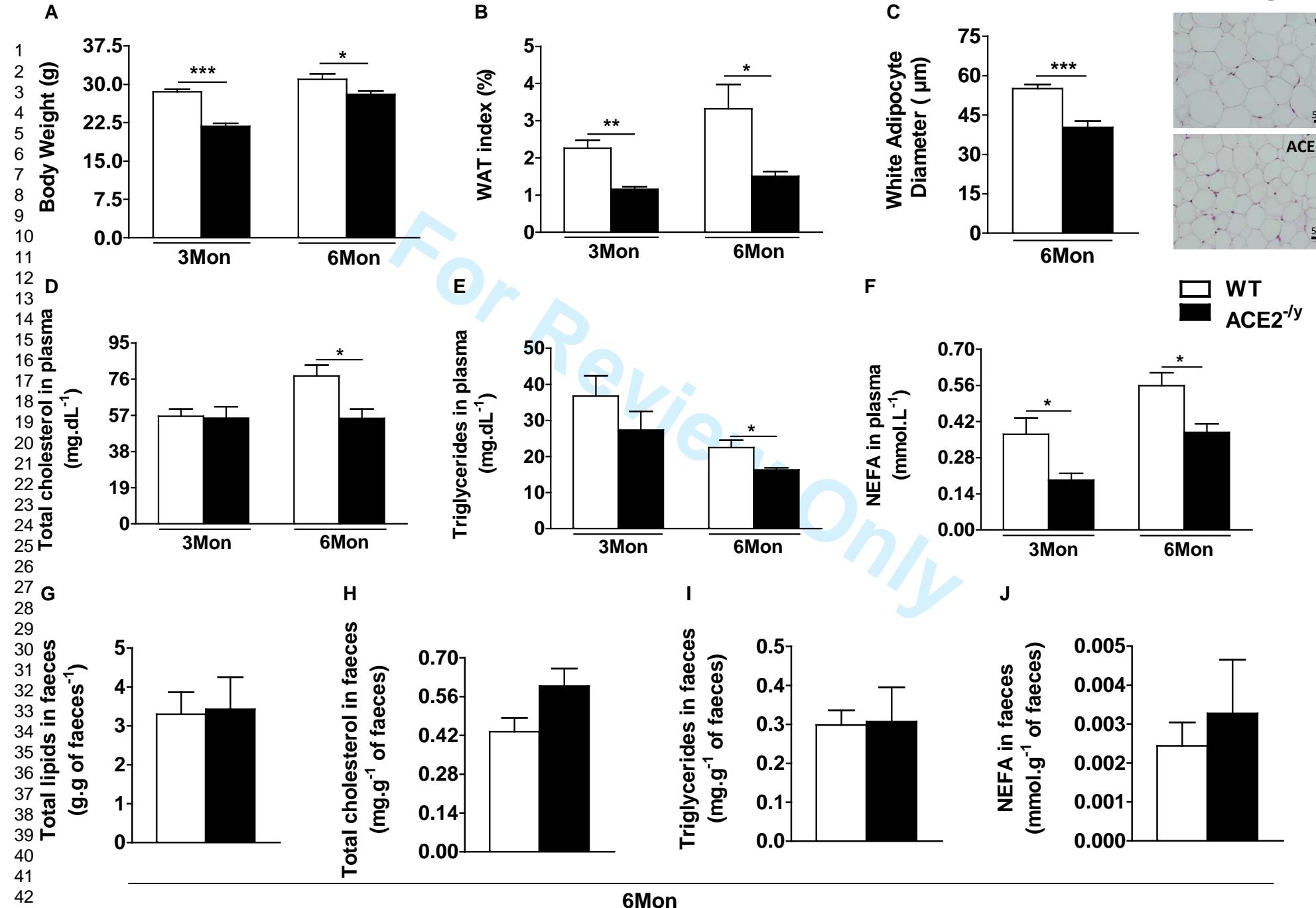
Table 1. Primer sequences used for real time quantitative PCR.

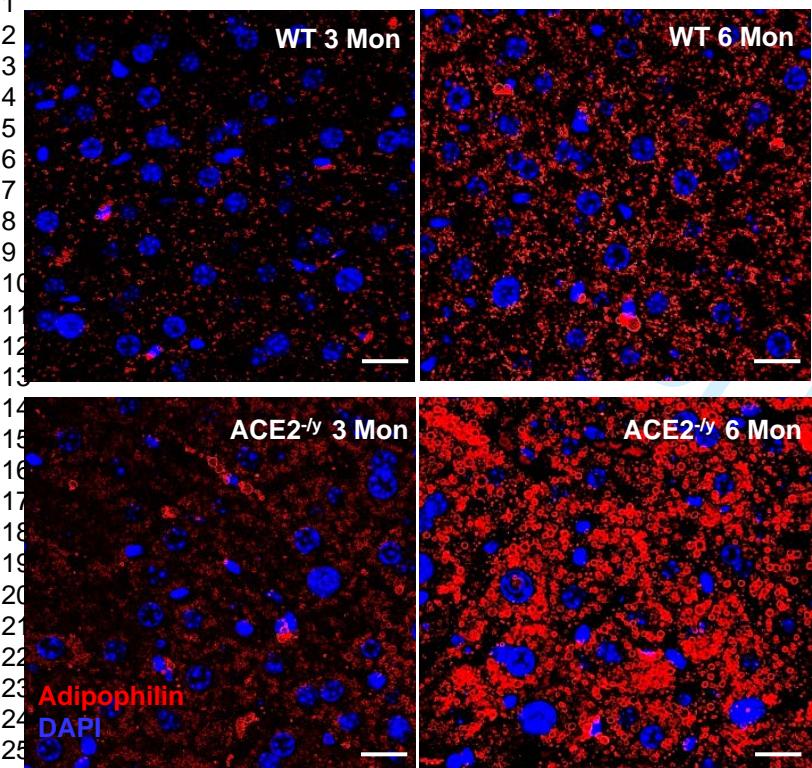
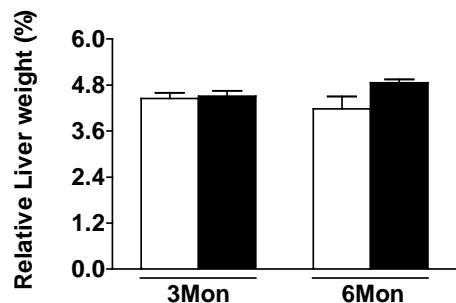
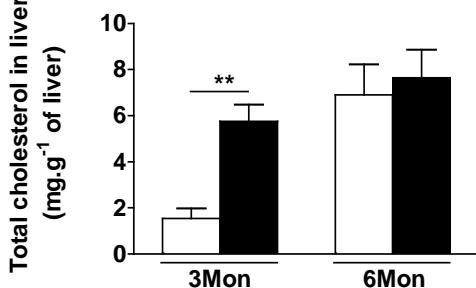
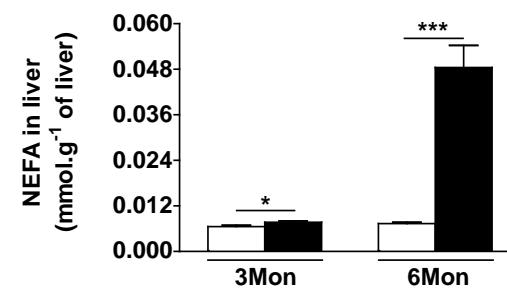
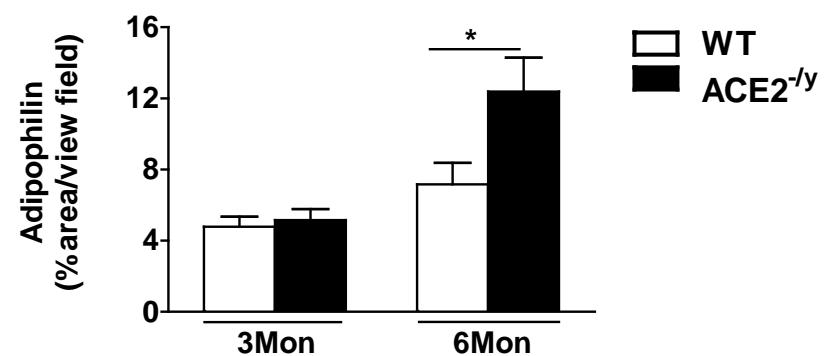
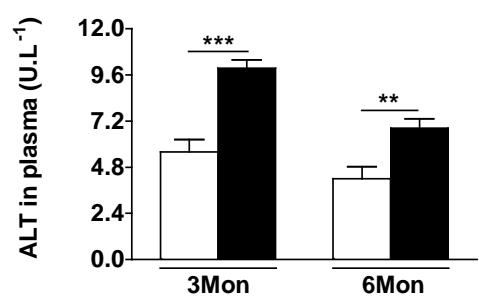
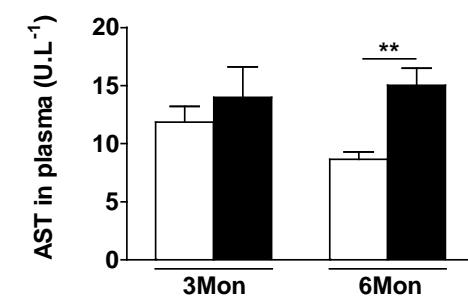
Primers	Sequence Forward and Reverse (5' – 3')
aP2	F: GTTGAGGATGGTGTCCACGTAC R: GTATGCCATGTGTGACCGGAG
CD36	F: CATGTAGGAAATGTGGAAGCGA R: TCTTCCAGCCAATGCCTTG
FAS	F: GAGGACACTCAAGTGGCTGA R: GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT
G6Pase	F: GACTGTGGGCATCAATCTCC R: ACAGGTGACAGGGAACTGCT
GAPDH	F: CCATCACCATCTTCCAGGAG R: GTGGTTCACACCCATCACAA
GCK	F: GGATGCAGAAGGAGATGGAC R: GCATCACCCCTGAAGTTGGTT
GLUT2	F: CAGTGTCTGCTACTGCTCTTCTG R: GAGACCTTCTGCTCAGTCGATG
IR	F: CCACCAATACGTCATTACAAC R: GGGCAGATGTCACAGAACCAA
PCK1	F: CCGTCTGGCTAAGGAGGAA R: GGGCATCAAACCTCATCCAG
PCK2	F: GGCTGGAAAGTGGAGTGTGT R: AGTACACACCCGCCATCACTG
PPAR γ	F: TCAGCTCTGTTGACCTCTCC R: ACCCTTGCATCCTTCACAAG
UCP2	F: GCATTGGCCTCTACGACTCT R: GTCCTGGTATCTCCGACCAC

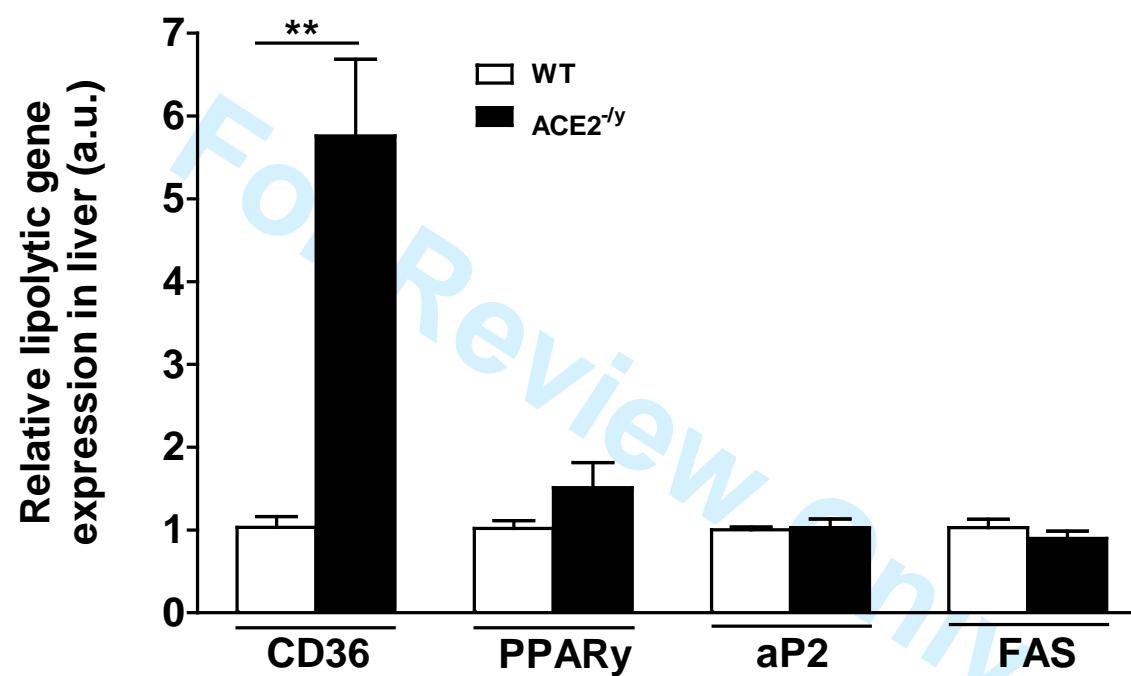
aP2: adipocyte Protein 2 (fatty acid binding protein); CD36: Cluster of Differentiation 36 (fatty acid translocase); FAS: Fatty Acid Synthase; G6Pase: Glucose 6-phosphatase; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GCK: Glucokinase; GLUT2: Glucose transporter type 2; IR: Insulin receptor; PCK1: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; PCK2: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; UCP2: Uncoupling protein 2.

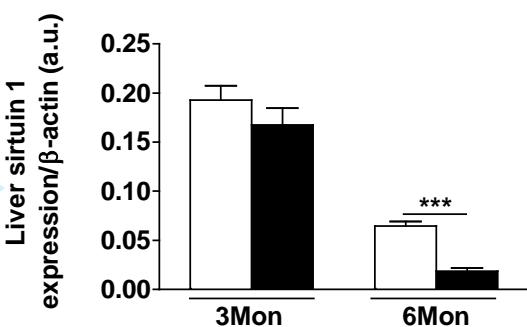
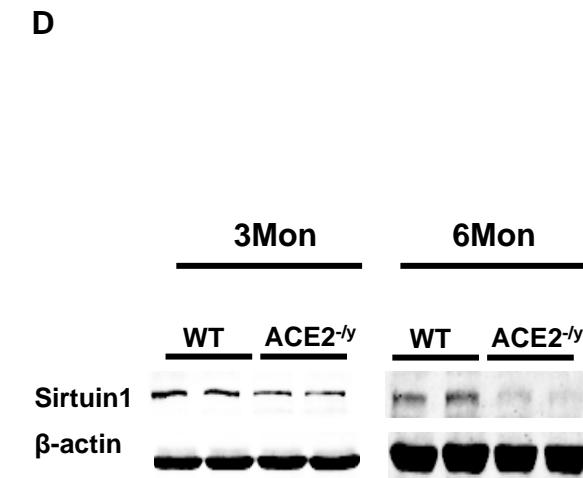
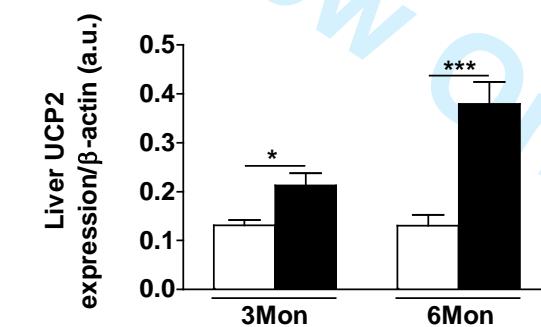
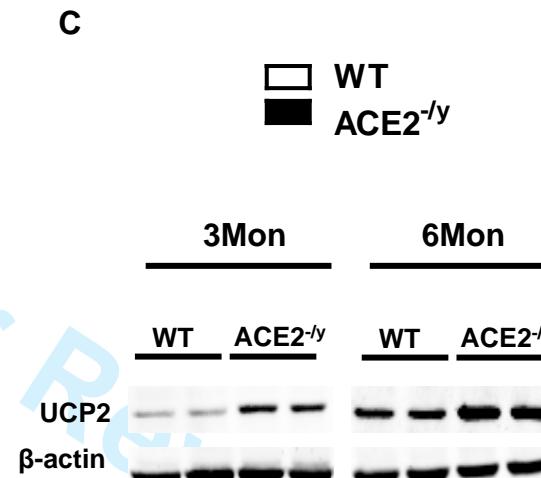
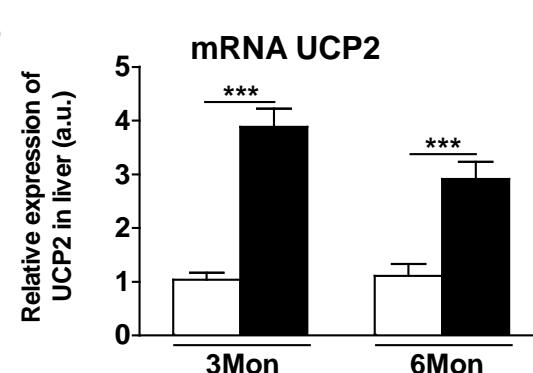
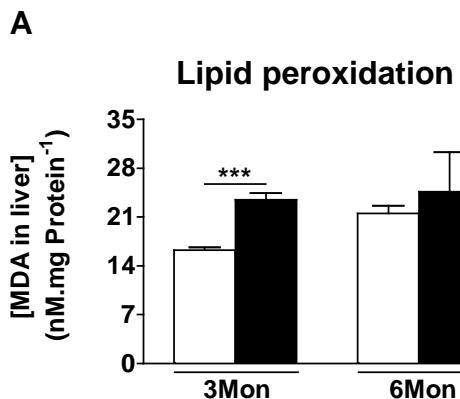
Figure 1

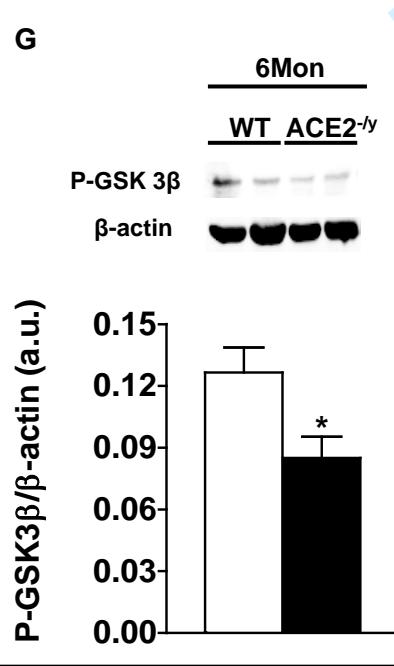
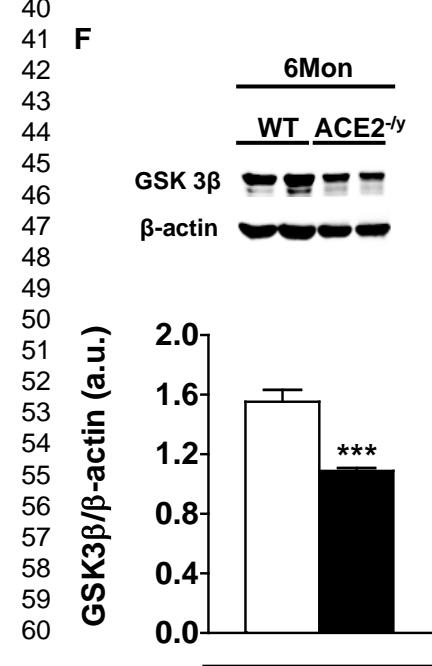
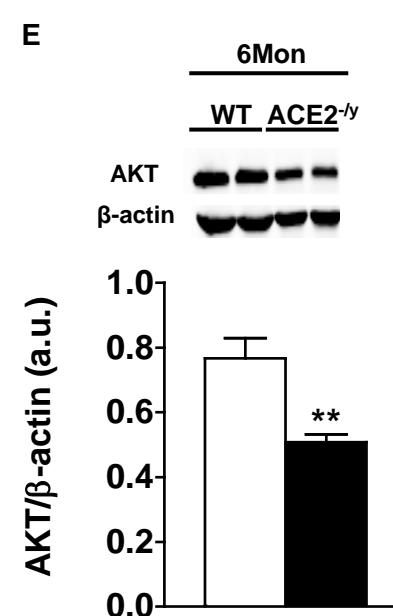
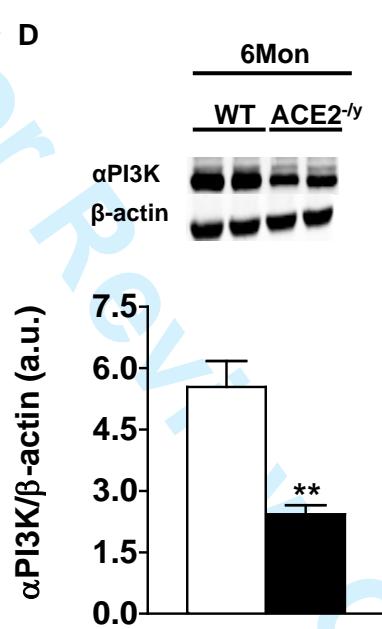
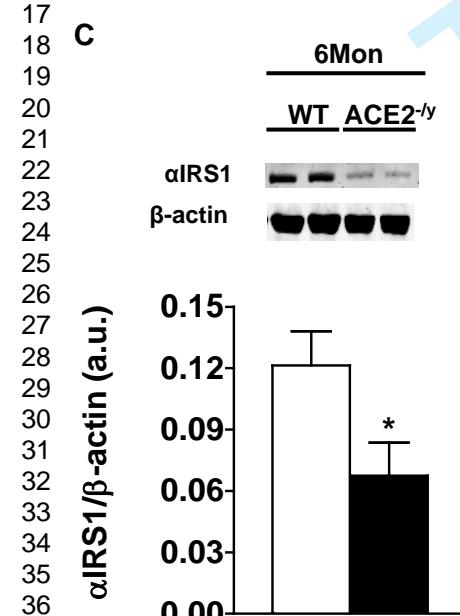
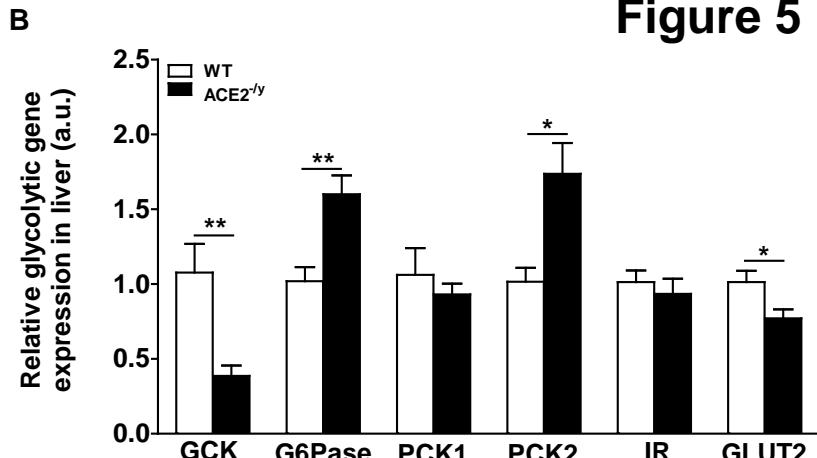
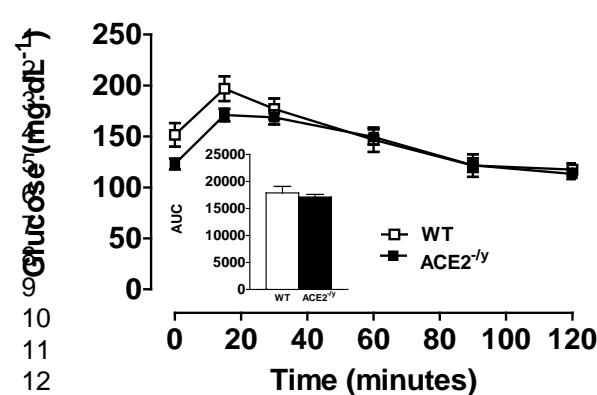
Page 23 of 27



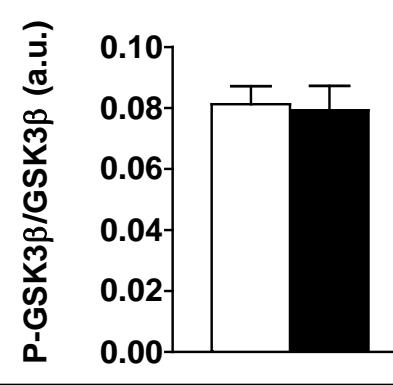
A**C****D****F****B****G****H**







WT (white), ACE2^{-/-} (black)



5 CAPÍTULO 2 – Avaliações metabólicas em camundongos com deleção gênica dupla para Apolipoproteína E e a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ApoE-ECA2^{-/-})

Os resultados desta Tese envolvem tanto o *knockout* para a ECA2^{-/-} quanto o duplo *knockout* para a ApoE e ECA2^{-/-} (ApoE-ECA2^{-/-}). Os resultados referentes ao ECA2^{-/-} foram apresentados no Capítulo 1 como artigos (submetido ao periódico *Diabetes, Obesity and Metabolism* e um outro a ser submetido no *The Journal of Clinical Investigation*, respectivamente). Entretanto, os achados referentes ao duplo *knockout* serão apresentados neste Capítulo como ainda não enviados para publicação, uma vez que o artigo está em processo de escrita. Somando-se a isso, os dados foram, conjuntamente, apresentados sob a forma de relatório ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), uma vez que o projeto foi aprovado no Edital “PROGRAMA CONJUNTO DE BOLSAS DE DOUTORADO na República Federal da Alemanha 2012/2013- DAAD - CAPES – CNPq”. O mesmo foi executado durante o “Doutorado Sanduíche” na Instituição Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC) Berlin-Buch.

5.1. Metodologia

5.1.1 Delineamento experimental e desenvolvimento do duplo knockout

Utilizou-se camundongos machos C57Bl/6, ApoE^{-/-} (provenientes do MDC-Berlin Facility) e ECA2^{-/-y} (gentilmente doados pelo Prof Josef Penninger) jovens (com idade variando entre 30-32 semanas).

Os animais foram mantidos em condições padrão de experimentação animal, onde tiveram livre acesso a água e alimentação *ad libitum*, ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00 h), temperatura variando entre 21 ± 2°C e condições adequadas de higienização. O projeto foi realizado de acordo com o ““Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 86–23, 1996).

Para geração do camundongo duplo knockout (ApoE_ECA2^{-/-y}), linhagens individuais de ApoE^{-/-} e ECA2^{-/-y} foram retrocruzadas por 10 gerações. A identificação genética foi confirmada pela genotipagem de cauda de cada geração. Utilizou-se o software “PyRat®” para gerenciamento das gerações decorrentes. Para os “set” experimentais, os animais foram divididos em quatro grupos contendo, no mínimo, 5 animais por grupo experimental: C57Bl/6, ApoE^{-/-} ECA2^{-/-y} e ApoE_ECA2^{-/-y}.

5.1.2 Peso corporal e glicemia de jejum

Avaliou-se o peso corporal dos animais em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu®). Os níveis de glicose foram determinados pela leitura no aparelho “Optium Xceed” (Abbott®). Para tanto, os animais foram mantidos em jejum noturno de 12 horas e em seguida submetidos à coleta de sangue a partir da veia caudal, após um pequeno corte na ponta da cauda do animal.

5.1.3 Avaliação da tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e gliconeogênese

Após restrição alimentar noturna de 12 horas, o teste de tolerância à glicose foi realizado. Após a aplicação intraperitoneal de 2 g de glicose.kg⁻¹ de peso corporal. Coletou-se uma gota de sangue (veia caudal) para verificação da glicemia no momento

anterior à aplicação (glicemia de jejum) e após a aplicação do carboidrato, de forma temporal, nos intervalos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (MOLNAR et al., 2005). O aparelho utilizado para leitura glicêmica foi o “Optium Xceed” (Abbott®).

Para a realização do teste de sensibilidade à insulina, os animais foram mantidos no estado alimentado e na sequência foi aplicado intraperitoneal 0,75 U de insulina.kg⁻¹ de peso corpóreo (ação rápida; Humulin®; Lilly, Indianápolis, EUA). Os níveis de glicose foram avaliados, assim como no teste supracitado, no momento anterior a aplicação e de forma temporal nos intervalos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (MOLNAR et al., 2005).

Para avaliação da capacidade glioneogênica do fígado a partir do piruvato, os animais foram mantidos em restrição alimentar de 16 horas e o teste foi realizado pela aplicação intraperitoneal de 2 g de piruvato.kg⁻¹ de peso corporal. A mensuração dos níveis de glicose foi semelhante à descrita anteriormente para a avaliação da tolerância à glicose.

5.1.4 Sacrifício animal e coleta dos órgãos

Após jejum noturno de 12 horas, os animais foram anestesiados com ketamina/xilasina (110/10 mg/kg; i.p.) e, em seguida, sacrificados por punção cardíaca. O fluido sanguíneo coletado durante este processo foi transferido para tubos tipo “eppendorf” de 1,5 mL heparinizados (25 UI/mL). Em seguida, o material biológico foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C, objetivando-se a separação do plasma e do componente eritrocitário para posteriores análises. O tecido adiposo branco epididimal foi retirado e pesado em balança semi-analítica (0,001 g; Shimatzu®) para avaliação do acúmulo de gordura. O fígado foi retirado para avaliação do acúmulo de gordura hepática. As amostras foram estocadas juntamente com o plasma e o componente eritrocitário, em freezer -86 °C para análises posteriores.

5.1.5 Perfil lipídico plasmático.

Os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram mensurados através de *Kit* comercial (Labtest®, Belo Horizonte, Brasil), e os níveis de ácidos graxos livres pelo *Kit* comercial da Wako Chemicals (GmbH®, Neuss, Alemanha), métodos enzimáticos

colorimétrico, adaptado para microplaca, observando-se as recomendações do fabricante.

5.1.6 Avaliação da função e lesão hepática

A função e lesão hepática foram mensuradas pela dosagem da atividade plasmática das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) através de *Kits* comerciais (Labtest[®], Belo Horizonte, Brasil).

5.1.7 Avaliações hepáticas

Após a pesagem do fígado total, procedeu-se um corte longitudinal de aproximadamente 5 mm de espessura no lóbulo direito destinado a análise histológica. Os fragmentos hepáticos foram fixados por imersão em formaldeído 4%. As amostras foram incluídas em parafina e em seguida, seccionadas tendo-se 3 µm como padrão para a espessura de corte. A ocorrência de deposição lipídica foi investigada pela coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). As secções para cada animal foram examinadas em microscópio (Biorevo[®] BZ-9000; Keyence, Itasca, Alemanha), fotografadas e analisadas.

5.1.8 Avaliações moleculares

5.1.8.1 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)

Objetivando-se a identificação de genes relacionados ao metabolismo e função cardiovascular nestes animais duplo *knockout*, investigou-se a expressão gênica no tecido adiposo e hepático pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. Para tanto, procedeu-se a extração de RNA (TRizol[®] Reagent, Darmstadt, Alemanha) e limpeza deste (RNeasy Mini kit, Qiagem, Hilden, Alemanha). Na sequência, realizou-se a síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA nos tecidos supracitados (Reverse Transcriptase – Invitrogen[®]). O produto da reação foi quantificado usando o GoTaq qPCR Master Mix (Promega[®]; Mannheim, Alemanha) por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Real time qPCR) (ABI

7900HT Real-Time PCR System-Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha). Este nucleotídeo foi mensurado como valor relativo comparado com uma referência interna, o *GAPDH*. Os valores quantitativos de expressão de RNA foram obtidos pelo parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os “primers” utilizados (amplicons entre 100 - 150 pares de base) foram os que seguem na **tabela 1**.

Tabela 1. Sequência de “primers” utilizados.

Primers	SequênciA Forward e Reverse (5' – 3')
<i>UCP2</i>	F: GCATTGGCCTCTACGACTCT R: GTCCTGGTATCTCCGACCAC
<i>GCK</i>	F: GGATGCAGAAGGAGATGGAC R: GCATCACCCCTGAAGTTGGTT
<i>G6Pase</i>	F: GACTGTGGGCATCAATCTCC R: ACAGGTGACAGGGAAGTGCT
<i>CD36</i>	F: CATGTAGGAAATGTGGAAGCGA R: TCTTCCAGCCAATGCCTTG
<i>PCK1</i>	F: CCGTCTGGCTAAGGAGGAA R: GGGCATCAAACCTTCATCCAG
<i>PCK2</i>	F: GGCTGGAAGTGGAGTGTGT R: AGTACACACCGCCATCACTG
<i>aP2</i>	F: GTTGAGGATGGTGTCCACGTAC R: GTATGCCATGTGTGACCGGAG
<i>GAPDH</i>	F: CCATCACCATCTTCCAGGAG R: GTGGTTCACACCCATCACAA

Legend: *UCP2*: Proteína desacopladora 2, *GCK*: Glicoquinase, *G6Pase*: Glicose 6-fosfatase, *CD36*: Cluster de Diferenciação 36 (translocase de ácido graxo), *PCK1*: Fosfoenolpiruvato carboxiqyinase 1, *PCK2*: Fosfoenolpiruvato carboxiqyinase 2, *aP2*: Proteína do adipócito 2 (proteína de ligação dos ácidos graxos), *GAPDH*: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

5.1.8.2 Análise de proteínas por *Western Blot*

Avaliou-se a expressão de proteínas relacionadas ao perfil glicêmico, lipídico e estresse oxidativo no tecido hepático e aórtico pela técnica de *Western Blot*, utilizando-se anticorpos específicos para cada proteína. Suscintamente, as proteínas foram isoladas usando um tampão de lise celular (Cell Signaling Technology®, Beverly, MA) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. (Roche®, Mannheim, Alemanha), e quantificadas pelo método de Bradford (1976). As proteínas foram separadas por eletroforese, transferidas para uma membrana de polivinilidene (PVDF). Na sequência, bloqueou-se e incubou-se com o anticorpo primário (overnight, 4°C). Após lavagens sucessivas, incubou-se com o anticorpo secundário (1:10.000) por 1 hora a temperatura ambiente. As proteínas foram quantificadas usando o equipamento *Odyssey® infrared imaging system* (Li-COR®, Biosciences, Lincoln, USA). Os anticorpos

utilizados foram: UCP2 (1:500), PI3K (1:500), α -IRS-1(1:1.000), Sirtuin1 (1:1.000), AKT (1:1.000) e GAPDH (1:2.000).

5.1.9 Análises estatísticas

Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel[®] (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph Pad Prism[®] 5.0 (San Diego, CA, USA), respectivamente. Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias seguido do teste de Tukey e Bonferroni, respectivamente. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

5.2 Resultados e Discussão

A **Figura 1** mostra a avaliação de peso corporal (**A**) e peso relativo de tecido adiposo branco epididimal (**B**) nos quatros grupos experimentais em questão, WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Os resultados indicam que a deleção da ECA2 reduz significativamente o peso corporal acompanhado da diminuição do acúmulo de tecido adiposo epididimal. A deleção conjunta da ECA2 e da ApoE (duplo knockout – 2KO) induziu uma redução significativa de peso corporal tanto em relação ao seu controle ApoE^{-/-} como ao WT. Enquanto que o peso relativo epididimal foi significativamente menor no duplo knockout em relação ao seu controle ECA2^{-/-} e ao WT.

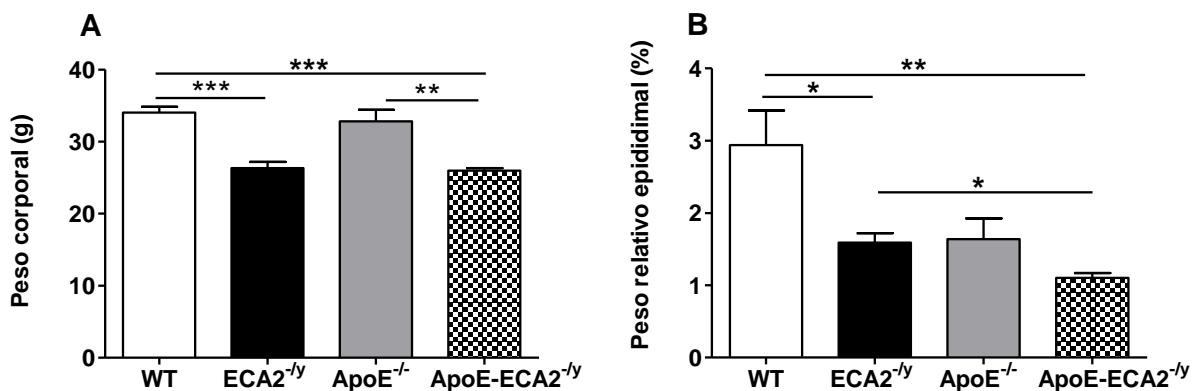


Figura 1: (A) Peso corporal (g); (B) Peso relativo epididimal (%) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM (n= 4-6). ANOVA uma via: *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

Nas avaliações plasmáticas lipídicas, observou-se uma diminuição do colesterol, triglicerídeo e ácidos graxos livres causada pela deleção da ECA2 (**Figura 2 A-C**). Como esperado, a deleção da ApoE causou um aumento significativo de colesterol e triglicerídeos plasmáticos (**Figura 2 A-B**). Uma vez que esta apolipoproteína participa do metabolismo normal lipídico e a ausência desta diminui a ligação das lipoproteínas aos seus respectivos receptores no fígado e nos tecidos periféricos, causando a menor captação e, consequentemente, aumento plasmático destas. Quando da deleção

conjunta da ECA2 e ApoE (2KO), observa-se uma diminuição nos níveis de triglicerídeos e ácidos graxos livres no plasma comparado ao controle ApoE^{-/-} (**Figura 2 B-C**), sugerindo uma importante participação da ECA2 no metabolismo lipídico, uma vez que o perfil lipídico desse *knockout* simples está significativamente menor. Por outro lado, tem-se níveis de colesterol semelhantes entre o 2KO e o ApoE (**Figura 2 A**). No entanto, comparando-se este ao controle ECA2^{-/-}, o 2KO apresentou valores significativamente maiores de colesterol e triglycerídeos, provavelmente devido a ação da deleção da ApoE (**Figura 2 A-B**).

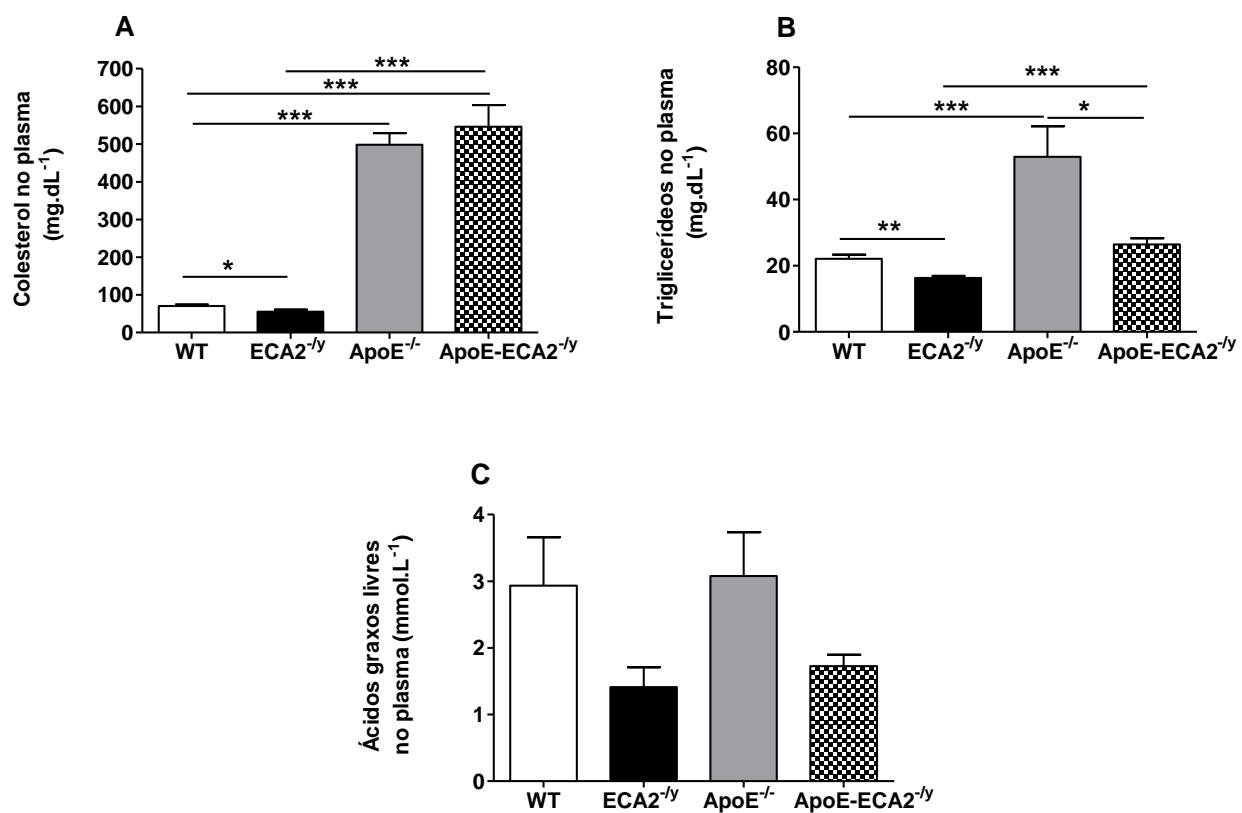


Figura 2: (A) Colesterol no plasma (mg.dL⁻¹); (B) Triglycerídeos no plasma (mg.dL⁻¹); (C) Ácidos graxos livres no plasma (mmol.L⁻¹) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM (n= 4-6). ANOVA uma via: *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

Nas avaliações glicêmicas os animais ECA2^{-/-} mostraram-se mais tolerantes à glicose e mais sensíveis à insulina quando comparados ao grupo WT. Isto é observado pela diminuição da curva glicêmica em função do tempo neste grupo (Figura 3 A e B).

Os animais *knockouts* apenas para a ApoE mostraram-se normais em relação às avaliações supracitadas comparado ao controle WT. No entanto, a deleção conjunta da ECA2 e da ApoE causou efeito semelhante aos animais com apenas a deleção para ECA2, ou seja, uma melhora significativa em ambos os parâmetros citados. Esses dados sugerem um envolvimento da enzima ECA2 no metabolismo glicêmico e/ou esta melhora glicêmica observada seja diretamente influenciada pela diminuição significativa do depósito de gordura abdominal e do perfil lipídico plasmático mostrados anteriormente nas **Figuras 1 e 2**.

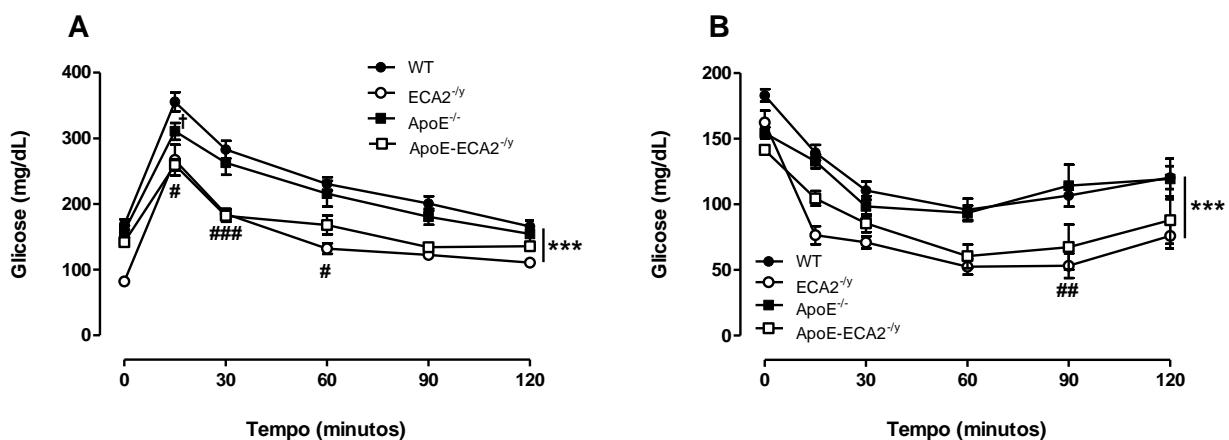


Figura 3: (A) Tolerância à glicose; (B) Resistência à insulina dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada ponto do gráfico representa a média ± EPM (n= 4-6). ANOVA duas vias com Bonferroni: ***p<0,001 ECA2^{-/-} vs WT; † ApoE^{-/-} vs WT; #p<0,05, ##p<0,01 e ### p<0,001 ApoE-ECA2^{-/-} vs ApoE^{-/-}.

Balizando-se nestes resultados, pensou-se na possibilidade de deposição ectópica lipídica, representando, desta forma, um quadro de lipodistrofia causada pela deleção da ECA2 e sua extensão quando da deleção conjunta com a ApoE. Sendo assim, avaliou-se primeiramente marcadores de dano e função hepática e na sequência a deposição lipídica neste órgão.

A **Figura 4** mostra a atividade da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) (**A** e **B**, respectivamente). Os dados demonstram que os animais ECA2^{-/-} apresentam elevação significativa da atividade dessas enzimas no plasma comparado ao WT, sugerindo fortemente injúria hepática. Os animais 2KO, por

sua vez, também apresentam elevação da atividade de ambas as enzimas semelhante aos animais ECA2^{-/-} e diferente dos animais ApoE^{-/-}, os quais apresentam níveis semelhantes ao WT, demonstrando, desta forma, que possivelmente a ausência da enzima ECA2 seja a responsável pelo dano hepático detectado e que essa injúria seja consequência de maior deposição lipídica.

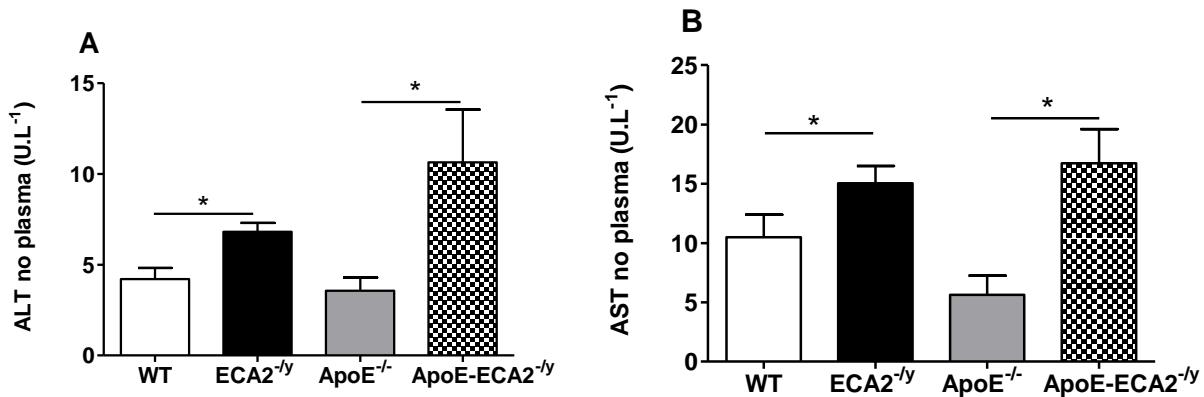


Figura 4: (A) Alanina aminotransferase (ALT) no plasma (U.L⁻¹); (B) Aspartato aminotransferase (AST) no plasma (U.L⁻¹) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM (n= 4-6). ANOVA uma via: *p<0,05.

A deposição lipídica ectópica foi inicialmente avaliada através de cortes histológicos do fígado corados com H&E. A **Figura 5** mostra um corte histológico hepático representativo de cada grupo experimental. Observa-se, qualitativamente, que os animais ECA2^{-/-} e 2KO apresentam uma maior deposição de microvesículas lipídicas no fígado, sendo mais acentuada nos animais 2KO. Estas são representadas pelos pequenos pontos brancos distribuídos em todo o campo visual da figura ao redor dos hepatócitos (destacado no círculo vermelho da figura representativa do 2KO; Figura 5). Além da maior deposição lipídica, os animais 2KO também apresentam áreas indicativas de infiltrado inflamatório (destacado no círculo preto da figura representativa do 2KO; Figura 5). Os dados indicam, mais uma vez, para o possível papel da enzima ECA2 no metabolismo lipídico.

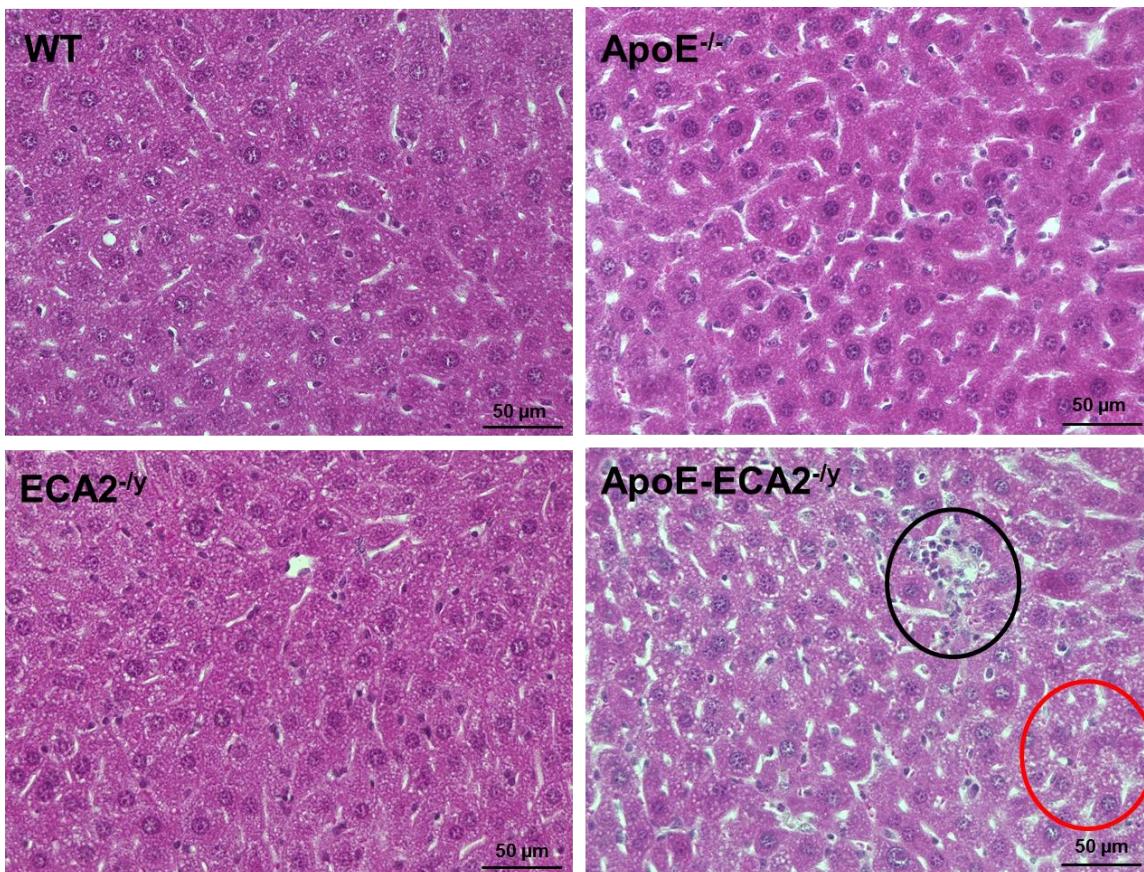


Figura 5: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos obtidos dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade, corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). A figura mostra deposição lipídica hepática (pontos brancos distribuídos em todo o campo visual da figura ao redor dos hepatócitos, destacado no círculo vermelho da figura representativa do 2KO) e área indicativa de infiltrado inflamatório (destacado no círculo preto da figura representativa do 2KO).

Baseado nos resultados apresentados até aqui, seguiu-se com a avaliação de possíveis mecanismos envolvidos na maior deposição lipídica hepática, assim como em outros possíveis danos advindos desta lipodistrofia apresentada pelos animais ECA2^{-/-} e 2KO.

Avaliou-se no fígado, por PCR quantitativo em tempo real, a expressão gênica relativa da molécula CD36, proteína participante da translocação dos ácidos graxos do plasma para o fígado (MIQUILENA-COLINA et al., 2011), e da aP2, proteína de ligação dos ácidos graxos expressa principalmente nos adipócitos (KRALISCH, FASSHAUER, 2013). Os resultados mostram que a expressão do CD36 no fígado dos animais ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e 2KO é significativamente maior comparado ao WT (**Figura 6A**). Entretanto, nos animais 2KO esta elevação está significativamente elevada em relação ao ApoE^{-/-},

porém é semelhante ao grupo ECA2^{-ly}, sugerindo que esta elevação seja em grande parte decorrente da deleção da ECA2. O grupo 2KO também apresentou um aumento significativo na expressão gênica hepática da aP2 comparado tanto ao WT como ao ApoE^{-/-} (**Figura 6B**), sugerindo que a deleção conjunta da ECA2 e da ApoE contribui para o aumento da deposição lipídica hepática.

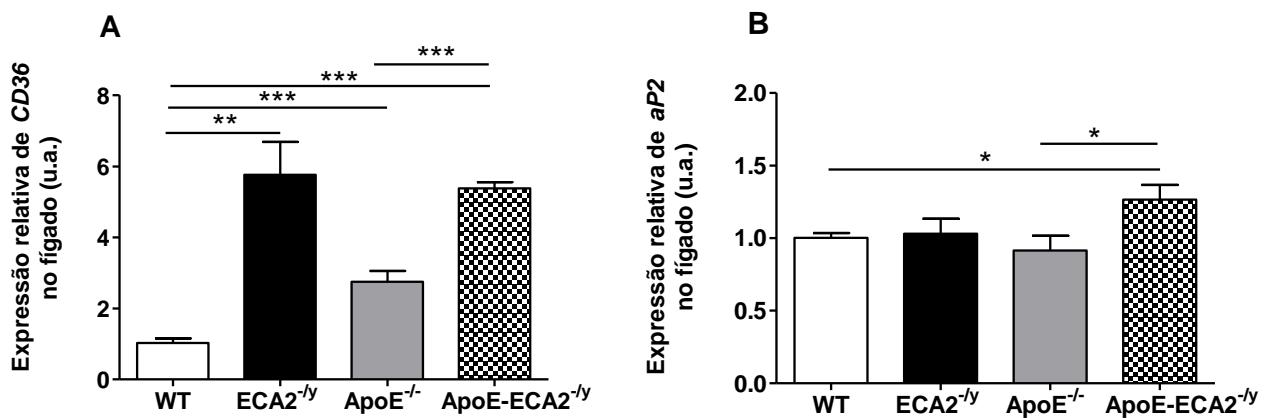


Figura 6: (A) Expressão relativa de CD36 no fígado (unidades arbitrárias); (B) Expressão relativa de aP2 no fígado (unidades arbitrárias) dos animais WT, ECA2^{-ly}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-ly}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM (n= 4-6). ANOVA uma via: *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

A sirtuina 1 é uma proteína envolvida na β-oxidação de ácidos graxos e a diminuição desta causa esteatose hepática (XU et al., 2010). Além disso, em camundongos heterozigotos deficientes nesta histona, a expressão de CD36 está elevada no fígado (XU et al., 2010). Este evento demonstra a relação entre a diminuição desta proteína e do aumento do CD36 com a deposição lipídica hepática (XU et al., 2010). Desta forma, para investigar se a via da sirtuina 1 está envolvida no mecanismo pelo qual a deleção da ECA2 causa maior deposição lipídica hepática, avaliou-se a expressão proteica de sirtuina 1 no fígado.

Os resultados demostram que, de fato, animais ECA2^{-ly} apresentam uma menor expressão proteica de sirtuina 1 hepática comparado ao WT (**Figura 7**). Interessantemente, esta diminuição permanece mesmo quando da dupla deleção ECA2 e ApoE. Entretanto, os animais *knockout* para ApoE não apresentaram diferença significativa na expressão da sirtuina 1 comparado ao WT, sugerindo, desta forma, que

a diminuição desta proteína seja consequência da deleção da ECA2. Somando-se, a expressão diminuída desta histona, pode diretamente contribuir com o maior acúmulo lipídico devido ao prejuízo na β -oxidação de ácidos graxos na mitocôndria (KEMPER et al., 2013). Assim, tanto a “upregulação” da via do CD36 (aumento da captação de ácidos graxos pelo fígado) quanto a “downregulação” da via da situina 1 (aumento do acúmulo lipídico advindo do prejuízo na oxidação destes) estão envolvidos no quadro esteatótico apresentado pelos animais ECA2^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}.

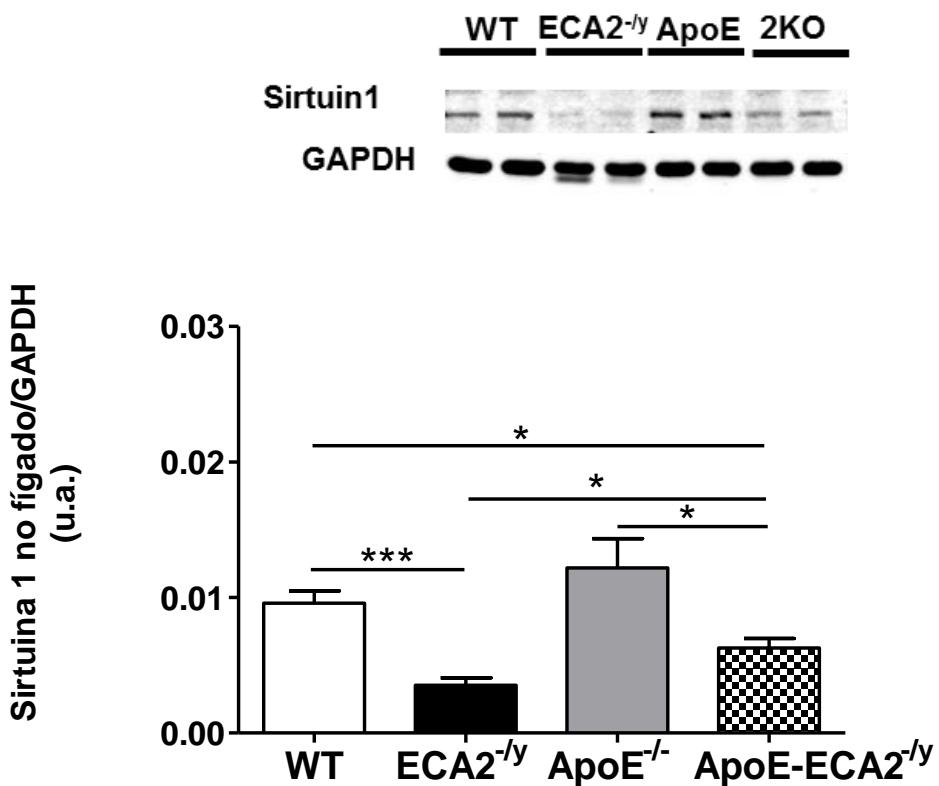


Figura 7: Expressão proteica de sirtuina 1 no fígado (unidades arbitrárias) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média \pm EPM (n=4-6). ANOVA uma via: *p<0,05 e ***p<0,001.

O prejuízo na β -oxidação de ácidos graxos na mitocôndria causa estresse oxidativo mitocondrial caracterizado pelo aparecimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GENTILE, PAGLIASSOTTI, 2008). Assim, na sequência, avaliou-se uma das principais proteínas mitocondriais que atua regulando os níveis fisiológicos de ERO, a proteína desacopladora 2 (UCP2), também considerado um marcador de estresse oxidativo (ZHOU et al., 2012). Os dados mostram que tanto a expressão

gênica quanto a expressão proteica da UCP2 estão elevadas nos animais ECA2^{-/-} e 2KO (**Figura 8 A e B, respectivamente**). Estes dados confirmam a participação mais efetiva da deleção da ECA2 no prejuízo da β-oxidação dos ácidos graxos, no aumento de estresse oxidativo mitocondrial e, consequentemente, no aparecimento de esteatohepatite, quadro caracterizado por deposição lipídica e inflamação advinda também do elevado estresse oxidativo.

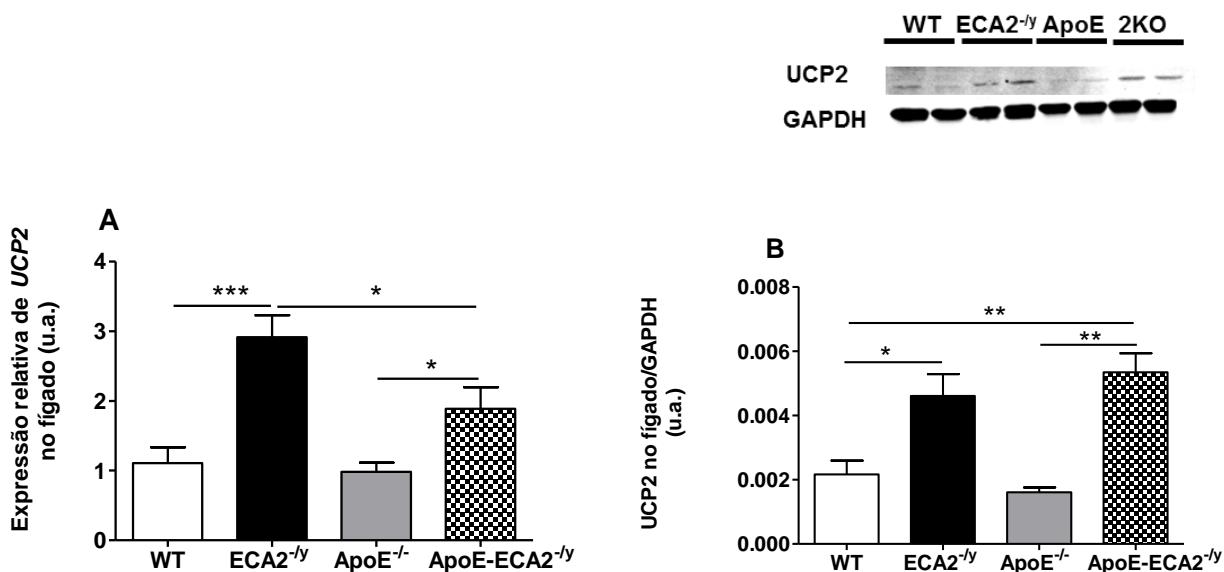


Figura 8: (A) Expressão relativa de UCP2 no fígado (unidades arbitrárias); (B) Expressão proteica de UCP2 no fígado (unidades arbitrárias) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM (n= 4-6). ANOVA uma via: *p<0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001.

Uma vez detectado o desenvolvimento esteatótico, avaliou-se os prejuízos hepáticos advindos deste quadro patogênico. Neste sentido, inicialmente, analisou-se a capacidade de produção de glicose hepática a partir do piruvato (gluconeogênese hepática). Os resultados mostram que tanto a deleção da ECA2 quanto da ApoE e, consequentemente, do 2KO, causaram uma diminuição da gliconeogênese no fígado. Entretanto, a diminuição é mais pronunciada quando da deleção da ApoE e não da ECA2 (**Figura 9A**). No intuito de identificar possíveis prejuízos da via glicêmica, mensurou-se a expressão gênica de proteínas participantes tanto da glicólise (glicoquinase – GCK - uma enzima que facilita a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato) quanto da gliconeogênese (glicose-6-fostatase – G6Pase - uma enzima que

hidrolisa a glicose-6-fosfato em glicose livre; e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase - *PCK1* e *PCK2* – isoformas citosólica e mitocondrial, respectivamente, que catalisam a conversão do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato). Os resultados expressos na **figura 9** mostram que os animais *ECA2^{-/-}* apresentam diminuição significativa de *GCK* e aumento significativo de *G6Pase* e *PCK2* comparado ao WT (**Figura 9B, C e E**). Ademais, nos animais *ApoE^{-/-}* observou-se aumento estatisticamente significativo de *G6Pase* comparado ao WT (**Figura 9C**). Os 2KO apresentaram aumento estatisticamente significativo de *GCK* comparado ao seu controle *ECA2^{-/-}* (**Figura 9B**) e aumento estatisticamente significativo de *PCK2* comparado aos seus dois controles, *ECA2^{-/-}* e *ApoE^{-/-}* (**Figura 9E**).

A análise da expressão proteica de participantes da via glicêmica (substrato do receptor da insulina 1 - IRS1; fosfatidilinositol 3-quinase - PI3K; e AKT), mostra desregulação nesta via apenas nos animais com deleção para a *ECA2* (**Figura 10 A, B e C**), demonstrando que o prejuízo lipídico hepático é seguido de prejuízo glicêmico quando da deleção da *ECA2*.

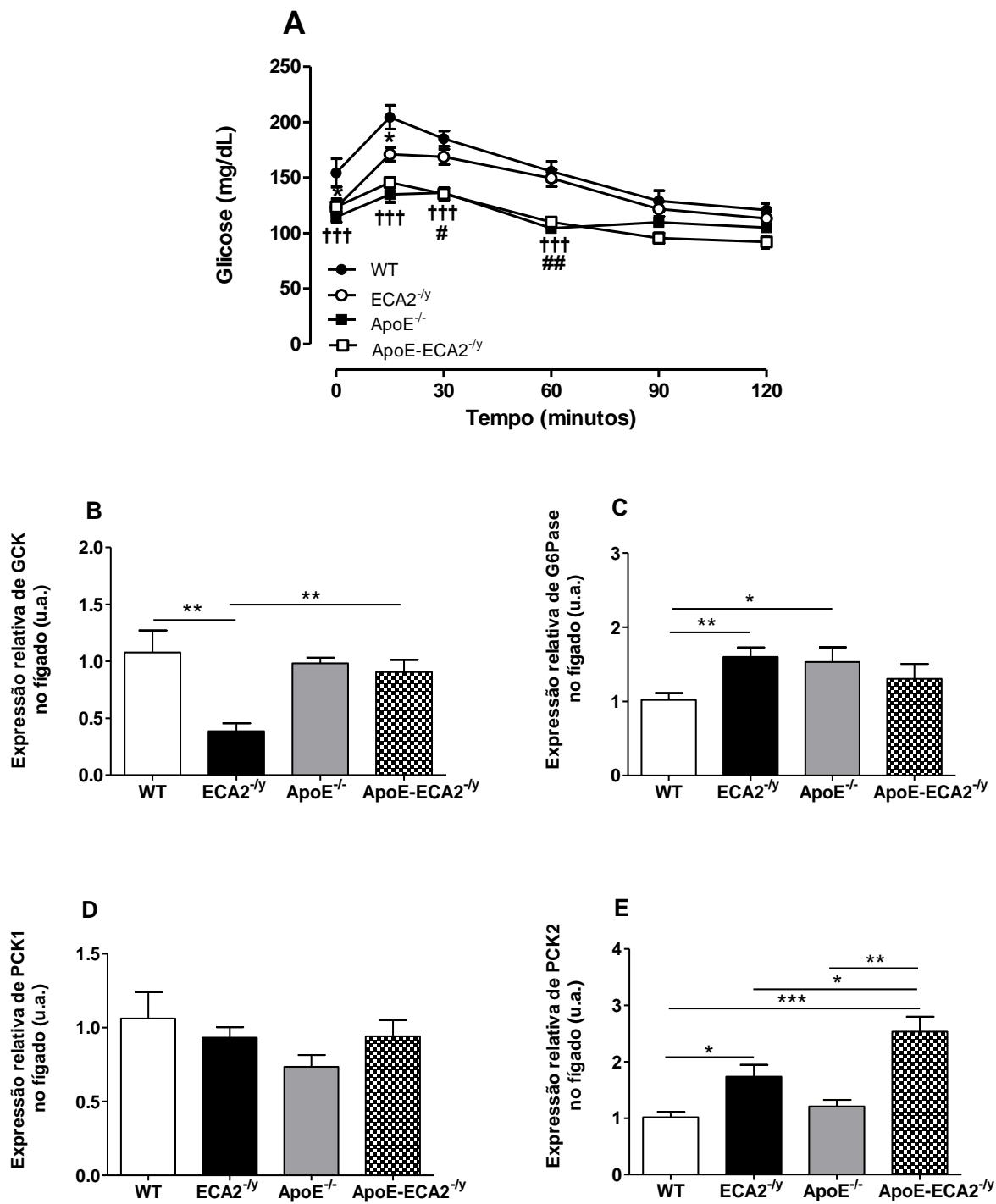


Figura 9: (A) Gliconeogênese hepática (B) Expressão relativa de *GCK* no fígado (unidades arbitrárias); (C) Expressão relativa de *G6Pase* no fígado (unidades arbitrárias); (D) Expressão relativa de *PCK1* no fígado (unidades arbitrárias); (E) Expressão relativa de *PCK2* no fígado (unidades arbitrárias) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada ponto do gráfico representa a média ± EPM ($n= 4-6$). ANOVA duas vias com Bonferroni: * $p<0,05$ ECA2^{-/-} vs WT; ††† $p<0,001$ ApoE^{-/-} vs WT; # $p<0,05$ e ## $p<0,01$ ApoE-ECA2^{-/-} vs ECA2^{-/-}. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM ($n= 4-6$). ANOVA uma via: * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

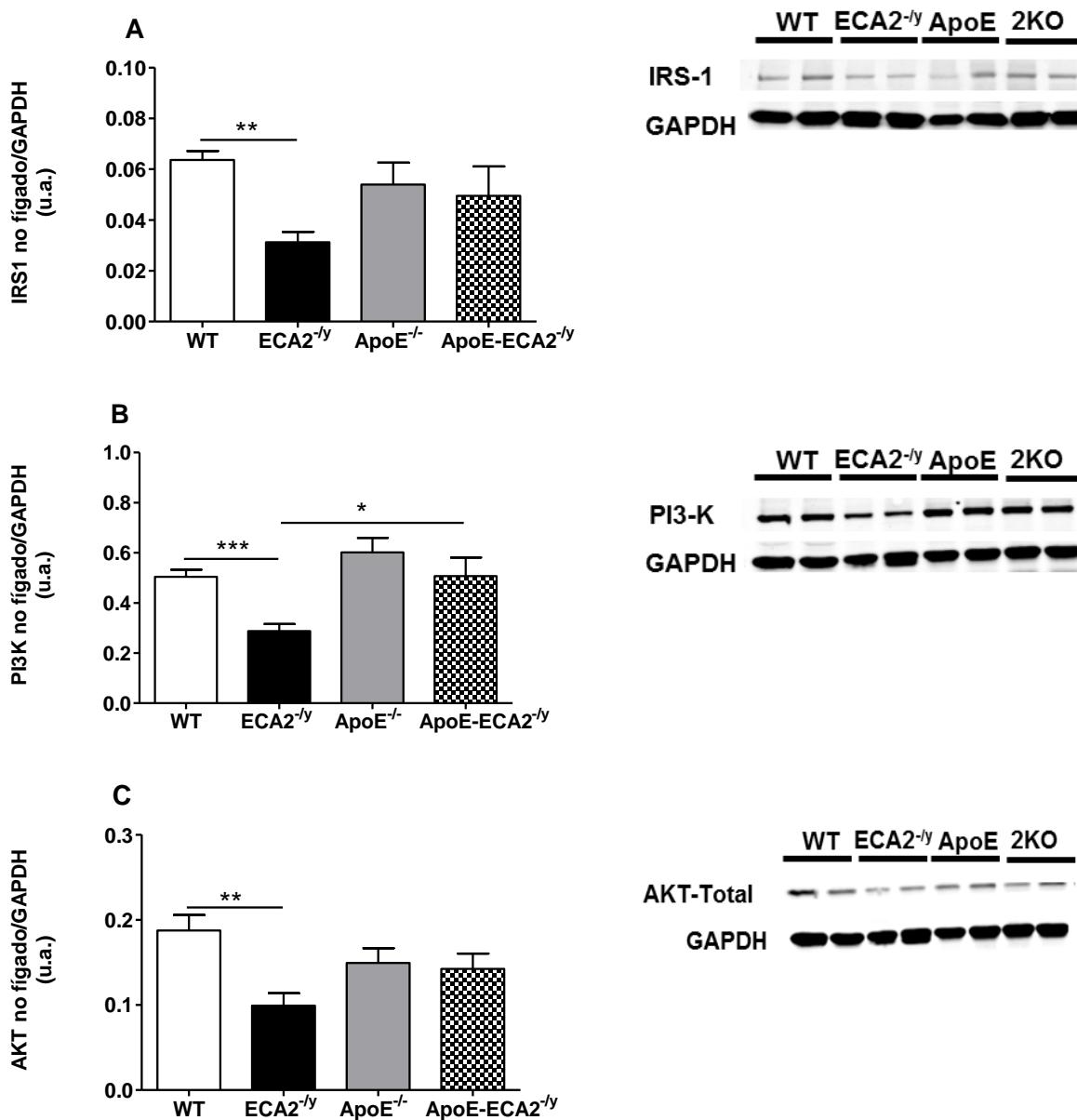


Figura 10: (A) Expressão proteica de IRS1 no fígado (unidades arbitrárias) (B) Expressão proteica de PI3K no fígado (unidades arbitrárias); (C) Expressão proteica de AKT total no fígado (unidades arbitrárias) dos animais WT, ECA2^{-/-}, ApoE^{-/-} e ApoE-ECA2^{-/-}, com 32 semanas de idade. Cada barra do gráfico representa a média ± EPM (n= 4-6). ANOVA uma via: *p<0,05; ** p<0,01 e ***p<0,001.

5.3 Conclusão

Em conjunto, os resultados demonstram que a deleção da ECA2 causa lipodistrofia, a qual, neste trabalho, é representada pela diminuição do perfil lipídico sistêmico e aumento da deposição lipídica hepática seguida de prejuízos na via glicêmica. As possíveis vias envolvidas nessa lipodistrofia são o aumento da CD36 e a diminuição da sirtuina 1 hepáticas. Somando-se, a dupla deleção causou o desenvolvimento de um animal com fenótipo similar ao ECA2^{-/-}. Esses resultados sugerem que também em uma condição patológica induzida geneticamente, neste caso a dislipidemia dos animais ApoE^{-/-}, o fenótipo dominante para os efeitos metabólicos provém da deleção da ECA2, indicando o papel importante desta enzima na regulação lipídica e glicêmica.

5.4 REFERÊNCIAS

BRADFORD, M.M. An rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

GENTILE, C.L.; PAGLIASSOTTI, M.J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.19, p.567-576, 2008.

KRALISCH, S.; FASSHAUER, M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? **Diabetologia**, v.56, p.10–21, 2013.

KEMPER, J.K.; CHOI, S.E; KIM, D.H. Sirtuin 1 Deacetylase: A Key Regulator of Hepatic Lipid Metabolism. **Vitamin Hormone.**, v.91, p.385-404, 2013.

MIQUILENA-COLINA et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. **Gut.**, v.60, p.1394-1402, 2011.

MOLNAR, J.; YU, S.; MZHAVIA, N.; PAU, C.; CHERESHNEV, I.; DANSKY, H.M. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice: **Circulation Research.**, v.96, p.1178-1184, 2005.

XU, F.; GAO, Z.; ZHANG, J.; RIVERA, C.A.; YIN, J.; WENG, J.; YE, J. Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1^{+/−} mice: a role of lipid mobilization and inflammation. **Endocrinology**, v.151, p.2504-2514, 2010.

ZHOU, M.; XU, A.; TAM, P.K.; LAM, K.S.; HUANG, B.; LIANG, Y.; LEE, I.K.; WU, D.; WANG, Y. Upregulation of UCP2 by adiponectin: the involvement of mitochondrial superoxide and hnRNP K. **PLoS One**, v.7, e32349, 2012.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez que, em camundongos C57BL/6, a deleção genética da enzima ECA2 causa lipodistrofia. Neste cenário, por um lado os animais apresentam peso corporal e deposição de TAB menor que o animal controle. Contudo, desenvolvem um fenótipo característico de esteatose hepática, demostrado pela alta deposição de lipídios no fígado.

Outros resultados, ainda paradoxais, demonstram que estes animais, sistemicamente, são mais tolerantes à glicose e apresentam alta sensibilidade insulínica. Entretanto, observou-se prejuízo na via de sinalização insulínica hepática. Com base nestas premissas, sugere-se fortemente que estes resultados estão diretamente correlacionados a lipodistrofia destes animais, uma vez que os lipídios se deslocam para o fígado (deposição ectópica), levando a diminuição de TAB.

Baseado nos achados do presente trabalho é plausível considerar que existe uma forte relação entre as ações da ECA2, a função hepática, a deposição adipocitária e o metabolismo de lipídios e glicose. Essa ação pode ser intrínseca ou não ao SRA, uma vez que se trata de uma enzima multifuncional ainda não completamente investigada.

Neste sentido, ECA2^{-/-} é um novo modelo animal para a lipodistrofia sistêmica e a esteatose hepática, representando uma interessante ferramenta de investigação tanto para novos tratamentos metabólicos como para rotas de sinalização envolvidas.

Ainda nesta direção, as avaliações no animal duplo *knockout* ApoE-ECA2^{-/-} possibilitou a confirmação de que a ECA2 de fato exerce um papel importante no metabolismo lipídico. A dupla deleção atenuou o perfil metabólico dislipidêmico dos animais ApoE^{-/-} e levou a geração de um fenótipo sistêmico semelhante aos animais

ECA2^{-/-}, a citar, diminuição do peso corporal, dos níveis de TG e dos ácidos graxos livres no plasma, somado a melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. No cenário exposto, acredita-se que os animais duplo *knockout* podem ser uma ferramenta importante para o estudo de possíveis vias comuns entre a aterosclerose e o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas. Além disso, este modelo animal possibilitará a avaliação futura de marcadores bioquímicos que caracterizem desarranjos metabólicos e vasculares comuns a aterosclerose, dislipidemia, metabolismo glicêmico e o SRA.

ANEXOS

ANEXO 1**Prêmio**

Apresentação Oral em Congresso

[Imprimir](#)[Fechar](#)

ECCR 2013 - Abstract Notification (ref. 2.2)

De: **Daniela Antognoli** (DAntognoli@hamptonmedical.com)
Enviada: sexta-feira, 2 de agosto de 2013 18:53:22
Para: valeriansouza@hotmail.com (valeriansouza@hotmail.com)
2 anexos
Oral notesFINAL.doc (38,5 KB) , 2.2.doc (27,0 KB)

Dear Miss Nunes-Souza

We are pleased to inform you that the ECCR Executive Committee has accepted your abstract number 22 entitled:

Protection against high fat diet-induced obesity in ACE2-deficient mice

for **ORAL** presentation at the forthcoming 17th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR) as follows:

Date: **Friday, 11 Oct 2013**

Time: **18:15 – 18:30 (10 minute presentation + 5 minute discussion)**

Presentation No: **2.2**

Please find attached:

Instructions for Oral Presenters

Copy of your abstract

To confirm your acceptance to attend the Meeting and make your presentation, please follow this link <http://sites.hmconline.co.uk/Pages/AuthorConfirmation/Login.aspx?ID=305> . You log in using the e-mail address and password you used to submit your abstract.

You will be able to change the name of presenter if necessary, and inform us of any changes to your abstract. **Only small typographical amendments are permitted.**

You must confirm NO LATER THAN FRIDAY 23 AUGUST 2013. Should confirmation of your participation not be received by that date, the Committee reserves the right to allocate your space to another presenter.

Please do not forget to register for the Meeting by **Friday 20 September 2013**. You may register online by following this link: <http://sites.hmconline.co.uk/Pages/DelegateRegistration/Login.aspx?ID=271>.

Yours sincerely

Daniela Antognoli

Hampton Medical Conferences

Rapier House, 4-6 Crane Mead, Ware, Hertfordshire SG12 9PW, U.K.

Direct Dial: +44 (0) 1920 88 5152

Switchboard: +44 (0) 1920 88 5162

Fax: +44 (0) 870 900 7783

Email: dantognoli@hamptonmedical.com

Visit our website: www.hamptonmedical.com

Please consider the environment before printing this e-mail or its attachment(s)

Hampton Medical Conferences Limited. Registered in England No. 2636129

Any opinions expressed in the email are those of the individual and not necessarily the company. This email and any files transmitted with it are confidential and solely for the use of the intended recipient to whom they are addressed. If you are not the intended recipient or the person responsible for delivering to the intended recipient, be advised that you have received this email in error and that any use is strictly prohibited.



www.eccr.org

17th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR)



Friday 11th - Sunday 13th October 2013

La Colle sur Loup - Nice, France

FINAL PROGRAMME

17.30-17.40	2.1	The adipokine visfatin induces telomere damage and cell senescence in human endothelial cells LA Villalobos, A Uryga, A Leivas, T Romacho, CF Sánchez-Ferrer, JD Erusalimsky, C Peiró (Madrid)
17.40-17.45		Discussion
17.45-17.55	2.2	Protection against high fat diet-induced obesity in ACE2-deficient mice V Nunes-Souza , N Alenina, JM Penninger, RAS Santos, M Bader, LA Rabelo (Berlin; Maceió; Belo Horizonte)
17.55-18.00		Discussion
18.00-18.10	2.3	High-fat diet induces endothelial dysfunction through a downregulation of endothelial AMPK-PI3-eNOS pathway CF García-Prieto , D Del Rio, I Aranguez, MS Fernandez-Alfonso, M Ruiz-Gayo, B Somoza (Madrid)
18.10-18.15		Discussion
18.15-18.45		Invited Speaker Max Nieuwdorp, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, Netherlands <i>Gut microbiota in obesity and diabetes mellitus; bystander or culprit?</i>
19.00-19.30		Drinks Reception
19.30		Dinner

2.2

PROTECTION AGAINST HIGH FAT DIET-INDUCED OBESITY IN ACE2-DEFICIENT MICE

Nunes-Souza V^{1,2,3}, Alenina N¹, Penninger JM⁴, Santos RAS^{1,3}, Bader M¹, Rabelo LA^{1,2,3}

¹Max Delbrück Center for Molecular Medicine., Berlin, Germany, ²Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC), Setor de Fisiologia e Farmacologia, ICBS/UFAL., Maceió/Al, Brazil, ³National Institute of Science and Technology in NanoBiopharmaceutics (N-BIOFAR)., Belo Horizonte, Brazil, ⁴Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences., Vienna, Austria

The study aimed to investigate the metabolic profile in ACE2-deficient (KO) mice.

Methods: Male C57Bl/6 (WT) and KO mice were analyzed at the age of 3, 6, and 12 (3M, 6M, and 12M) months under normal diet (ND) and 6M and 12M after 20-22 weeks of high-fat diet (HFD). Assessments of body weight (BW), glycemic and lipid profile were performed. The total fat content was quantified by nuclear magnetic resonance. The plasma adiponectin and leptin levels were assessed by ELISA. The expression of leptin and adiponectin mRNA in the white adipose tissue (WAT) was evaluated by RTqPCR.

Results: Under ND KO mice showed lower BW at all ages (3M WT=28.6±0.5 vs KO=21.8±0.6, p 0.001; 6M WT=31.0±1.1 vs KO= 28.0± 0.7, p 0.001; 12M WT=32.2±0.4 vs KO=27.3±0.6, p 0.001). This difference was even more pronounced after HFD at 6M of age (WT=44.6±1.3 vs KO=34.1±1.3, p 0.001), but, surprisingly, was blunted at the age of 12M. The BW reduction was accompanied by decreased WAT in KO mice. For all groups, no significant changes were observed in fasting glucose and insulin levels, but the KO mice showed improved glucose tolerance and enhanced insulin sensitivity. Moreover, KO mice showed lower levels of cholesterol, triglycerides, free fatty acids, and leptin and increased adiponectin levels in plasma. Accordingly, the mRNA expression in WAT was decreased for leptin and elevated for adiponectin in KO mice in comparison to WT.

Conclusion: Deletion of ACE2 interferes with glycemic/lipid/BW homeostasis. ACE2-deficient mice are protected from HFD-induced obesity, probably by an age-dependent mechanism.

ANEXO 2**Participação em artigo****“Genetic deletion of ACE2 induces endothelial dysfunction in C57Bl/6 mice via oxidative/nitrosative stress”**

Luiza A. Rabelo^{1,2,3}, Mihail Todiras¹, Valéria Nunes-Souza^{1,2,3}, Fatimunnisa Qadri^{1,4}, Josef M. Penninger⁵, Robson A. Santos^{3,6}, Michael Bader^{1,4,6}, Natalia Alenina^{1,6}

¹Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

²Laboratório de Reatividade Cardiovascular, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NanoBiofarmacêutica (NanoBIOFAR)

⁴Charité University Medicine, Berlin, Germany

⁵Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria

⁶Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Artigo submetido no periódico *Vascular Pharmacology* (Manuscript number VPH-D-14-00174)

Endereço eletrônico do periódico <http://www.journals.elsevier.com/vascular-pharmacology/>

Elsevier Editorial System(tm) for Vascular Pharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Genetic deletion of ACE2 induces endothelial dysfunction in C57BL/6 mice via oxidative/nitrosative stress

Article Type: Full Length Article

Keywords: Angiotensin converting enzyme 2, ACE2-deficient mice, endothelial dysfunction, eNOS, *NO, antioxidant enzymes, oxidative stress.

Corresponding Author: Dr. Natalia Alenina,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Luiza A Rabelo, PhD

Order of Authors: Luiza A Rabelo, PhD; Mihail Todiras, MD, PhD; Valéria Nunes-Souza, PhD; Fatimunnisa Qadri, PhD; Josef Penninger, PhD; Michael Bader, PhD; Robson A Santos, MD, PhD; Natalia Alenina

Abstract: Accumulating evidence indicates that ACE2 plays a critical role in cardiovascular homeostasis, and its altered expression is associated with major cardiac and vascular disorders. Recent studies suggest that oxidative stress, which is elevated in cardiovascular disease, contributes to endothelial dysfunction. Thus, the aim of this study was to evaluate the regulation of vascular function and assess the vascular redox balance in ACE2-deficient animals. Experiments were performed in 20-22 week-old C57BL/6 and ACE2-/y male mice. Application of endothelium-dependent and -independent agents revealed an impairment of the *in vivo* endothelial function in ACE2-/y mice. Drastic reduction in eNOS expression at both protein and mRNA levels, and a decrease in *NO concentrations were observed in aortas of ACE2-/y mice in comparison to controls. Consistent with this, these mice presented a lower plasma and urine nitrite concentration, confirming reduced *NO availability in ACE2-deficient animals. Lipid peroxidation was significantly increased and superoxide dismutase activity was decreased in aorta homogenates of ACE2-/y mice, indicating impaired antioxidant capacity. Taken together, our data indicate, that the ACE2/Ang-(1-7)/Mas arm of the RAAS regulates endothelial function by modulating the oxidative/nitrosative balance. Thus, ACE2-deficient mice provide a suitable model for assessing vascular function to investigate new therapeutic tools for the treatment of cardiovascular diseases.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

ANEXO 3**Artigo decorrente do estágio didático em Fisiologia I e II****"A student-centered approach for developing active learning: the construction of physical models as a teaching tool in medical physiology"**

Flávio Moura Rezende-Filho^{1*}, Lucas José Sá da Fonseca^{1*}, Valéria Nunes-Souza^{1,2,3,4}, Glaucevane da Silva Guedes^{1,2,3,5}, Luiza Antas Rabelo^{1,2,3,4}

*Both authors contributed equally to this study

¹Laboratório de Reatividade Cardiovascular, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil.

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Maceió, Alagoas, Brazil.

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NanoBiofarmacêutica (N-BIOFAR), Belo Horizonte, Brazil.

⁴Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany.

⁵Faculdade de Nutrição (FANUT), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil.

TECHNICAL ADVANCE

Open Access

A student-centered approach for developing active learning: the construction of physical models as a teaching tool in medical physiology

Flávio Moura Rezende-Filho^{1†}, Lucas José Sá da Fonseca^{1†}, Valéria Nunes-Souza^{1,2,3,4}, Glaucevane da Silva Guedes^{1,2,3,5} and Luiza Antas Rabelo^{1,2,3,4*}

Abstract

Background: Teaching physiology, a complex and constantly evolving subject, is not a simple task. A considerable body of knowledge about cognitive processes and teaching and learning methods has accumulated over the years, helping teachers to determine the most efficient way to teach, and highlighting student's active participation as a means to improve learning outcomes. In this context, this paper describes and qualitatively analyzes an experience of a student-centered teaching-learning methodology based on the construction of physiological-physical models, focusing on their possible application in the practice of teaching physiology.

Methods: After having Physiology classes and revising the literature, students, divided in small groups, built physiological-physical models predominantly using low-cost materials, for studying different topics in Physiology. Groups were followed by monitors and guided by teachers during the whole process, finally presenting the results in a Symposium on Integrative Physiology.

Results: Along the proposed activities, students were capable of efficiently creating physiological-physical models (118 in total) highly representative of different physiological processes. The implementation of the proposal indicated that students successfully achieved active learning and meaningful learning in Physiology while addressing multiple learning styles.

Conclusion: The proposed method has proved to be an attractive, accessible and relatively simple approach to facilitate the physiology teaching-learning process, while facing difficulties imposed by recent requirements, especially those relating to the use of experimental animals and professional training guidelines. Finally, students' active participation in the production of knowledge may result in a holistic education, and possibly, better professional practices.

Keywords: Active learning, Meaningful learning, Teaching-learning methodologies, Medical education

Background

Taking into account that innovation in medical education is not an easy task [1], a considerable body of knowledge about cognitive processes and methods of teaching and

learning has accumulated in recent decades, helping teachers to determine the most efficient way to teach. Scientific evidence has shown that active student participation facilitates the assimilation and consolidation of new knowledge, and improves learning outcomes [2-5]. In addition, literature favors the concept that information should be provided simultaneously in multisensory modalities, since a considerable amount of data indicates that the most complete and successful strategy for teaching physiology to a diverse group of students consists in offering information in a manner that addresses multiple learning styles [6-11], satisfying visual, aural and kinesthetic learners [2,12-15].

* Correspondence: luizaa.rabelo@gmail.com

†Equal contributors

¹Laboratório de Reatividade Cardiovascular, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival de Melo Mota S/N, Bairro Tabuleiro dos Martins, Maceió 57072-900, Alagoas, Brazil

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Maceió, Maceió, Alagoas, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

ANEXO 4**Participação em patente depositada**

Inventores: RABELO, L. A.; GUEDES, G. S.; SOUZA, V.N.

Título: Composição alimentícia nutracêutica contendo cereais integrais e resíduo sólido de carapaça de caranguejo.

Categoria: Produto e Processo.

Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

País: Brasil.

Natureza: Patente de Invenção.

Número do registro: BR10201302751.

Data de depósito: 04/10/2013.

Data de concessão: 25/02/2014.

Depositante/Titular: Luiza Antas Rabelo, Glaucevane da Silva Guedes, Valéria Nunes de Souza. Depositante/Titular: Universidade Federal de Alagoas.

→ 4 DE 10 10 2009

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR

**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento:		Código: FQ001	Versão: 2
Depósito de Pedido de Patente		Procedimento:	
		DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Alagoas
 1.2 Qualificação: Universidade
 1.3 CNPJ/CPF: 24464109/0001-48
 1.4 Endereço Completo: Av Lourival Melo Mota, s/n Campus A.C.Simões, Maceió-AL
 1.5 CEP: 57072-900
 1.6 Telefone: 82 3214 1064 1.7 Fax:
 1.8 E-mail: sbuchoa@gmail.com, nit.ufal@gmail.com

 continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

COMPOSIÇÃO ALIMENTÍCIA NUTRACÊUTICA CONTENDO CEREAIS INTEGRAIS E RESÍDUO SÓLIDO DE CARCAÇAS DE CARANGUEJOS

 continua em folha anexa**4. Pedido de Divisão: do pedido Nº****Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa



DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Titulo do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		
	Código: FQ001	Versão:	2
	Procedimento: DIRPA-PQ006		

6. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Glaucevane da Silva Guedes

6.2 Qualificação: Docente

6.3 CPE: 049 753 714-13

6.4 Endereço Completo: Conjunto José Tonáris, placa 77, sala 100

6.5 CEP: 58246-27-

66 Telefone 82-2216-1155

67 FAX

6.8 E-mail: glaucovane@uol.com.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial

□

Declaração de divulgação ante

Artigo 12 da LFI – período de graça.
Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaracão na forma do item 3.2 da Instru o o Normativa-PB - o 17/2015

- Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9 Procurador (74):

9.1 Name:

92 CNP /CPE

9.3 APK/OAR

94 Endorsements

255

0.6 T=1.6

8-10-1

200 5 "

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas

Listagem de sequências biológicas.
Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos que contêm:

1



DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		
	Código: FQ001 Versão: 2 Procedimento: DIRPA-PQ006		

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados	folhas
<input checked="" type="checkbox"/> 11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	
<input type="checkbox"/> 11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/> 11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/> 11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/> 11.5	Relatório descritivo.	24
<input checked="" type="checkbox"/> 11.6	Reivindicações.	02
<input checked="" type="checkbox"/> 11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	05
<input checked="" type="checkbox"/> 11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/> 11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/> 11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/> 11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/> 11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/> 11.13	Outros (especificar) Anexo de Inventores	01

12. Total de folhas anexadas: 33 fls.

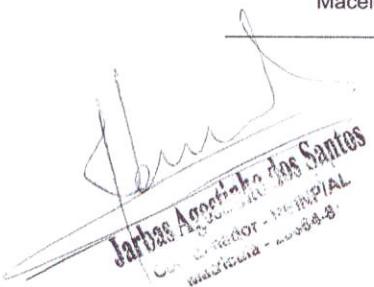
13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Maceió, 2 de Outubro de 2013

Local e Data


Assinatura é Carimbo

Rachel Rocha de A. Barros
Vice-Reitora no Exercício da Reitoria


Jarbas Agostinho dos Santos
Vice-Reitor - INPI/AL
Assinatura - 2013-08-08

Anexo de Inventores

6.1 Nome: Luiza Antas Rabelo

6.2 Qualificação: Docente

6.3 CPF: 893.538.704-53

5 6.4 Endereço Completo: Av. Jorge Montenegro Barros, S/N Quadra A, lote09.
Condomínio Jardins de La Reina, Santa Amélia.

6.5 CEP: 57063-000 **6.6 Telefone:** (82)99125716 **6.7 Fax:** (82) 3221-2501

6.8 E-mail: luizaa.rabelo@gmail.com

10

6.1 Nome: Valéria Nunes de Souza

6.2 Qualificação: Discente

6.3 CPF: 058.526.204-75

15 6.4 Endereço Completo: Av. Gustavo Paiva 2220. Bl. 07, Apt. 304,
Mangabeiras.

6.5 CEP: 57031-900

6.6 Telefone: (82) 3336-3444 / (82) 9913 4998

6.7 Fax: -

6.8 E-mail: Valeriansouza@hotmail.com

20

6.1 Nome: Reidson Beiriz Verçosa

6.2 Qualificação: Discente

6.3 CPF: 041.695.544-42

25 6.4 Endereço Completo: Rua João Farias Filho, 105 Conjunto José Maria de
Melo, Tabuleiro dos Martins.

6.5 CEP: 57081-085

6.6 Telefone: (82) 3336-344 / (82) 8806-7575

6.7 Fax: -

6.8 E-mail: reidson_beiriz@hotmail.com