

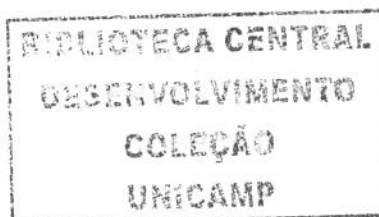
JULIANA CONTIN MORAES

**EFEITOS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL - α
SOBRE A EXPRESSÃO DA SINTASE DE ÓXIDO NITRICO
NEURONAL E INDUZÍVEL EM HIPOTÁLAMO DE
RATOS - IMPLICAÇÕES SOBRE O CONTROLE DA FOME**

CAMPINAS

2006

i



JULIANA CONTIN MORAES

**EFEITOS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL - α
SOBRE A EXPRESSÃO DA SINTASE DE ÓXIDO NITRICO
NEURONAL E INDUZÍVEL EM HIPOTÁLAMO DE
RATOS - IMPLICAÇÕES SOBRE O CONTROLE DA FOME**

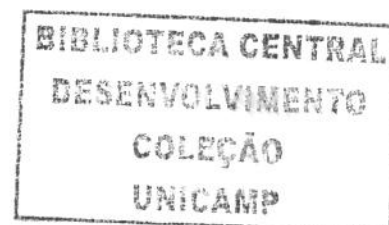
*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, área de concentração em
Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2006

ii



UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
M791e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 70561
PROC 16.12306
C _____ D x
PREÇO 11,00
DATA 27/09/06 Bib ID 387967
Nº CPD _____

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M791e Moraes, Juliana Contin
Efeitos do fator de necrose tumoral – α sobre a expressão da sintase de óxido nítrico neuronal e induzível em hipotálamo de ratos – implicações sobre o controle da fome / Juliana Contin Moraes. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citocinas. 2. Alimentos - Consumo. 3. Insulina. 4. Óxido Nítrico. 5. Sintase do óxido nítrico. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Slp/fcm

Título em inglês : Inducible-NOS but not neuronal-NOS participate in the acute effect of TNF- α on hypothalamic insulin-dependent inhibition of food intake

Keywords: • Cytokine
• Food intake
• Insulin
• Nitric oxide
• Nitric Oxide Synthase

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Ciências Básicas


**Banca examinadora: Prof Dr Lício Augusto Velloso
Prof Dr José Barreto Carvalheira
Profa. Dra. Silvana Bordin**

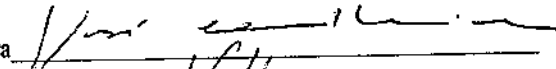
Data da defesa: 16-02-2006

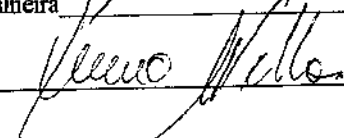
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Silvana Bordin 

2. Prof(a). Dr(a). José Barreto Campello Carvalheira 

3. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso 

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/02/2006

DEDICATÓRIA

*Marcos e Yolanda: Não só meu pai e minha mãe,
mas acima de tudo, meus amigos para sempre.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Lício Augusto Velloso, por essa oportunidade e por sua confiança em mim. Agradeço sua atenção, seus ensinamentos, sua paciência (principalmente com minhas crises de nervosismo!), sua serenidade e bom-humor.

Aos meu pais, pelo incentivo, orgulho, alegria, confiança e ensinamentos de vida.

Ao meu noivo, Rodrigo, por seu amor, sua paciência, suas palavras de carinho (e muitas vezes de bronca..) de sua presença em muitos experimentos e na minha vida.

Agradeço, mas ao mesmo tempo peço perdão, aos meus ratinhos e camundongos...

Agradeço muito meus amigos, que conheci há pouco tempo, mas que já são muito importantes para mim: Dennys, Angélica, Fernanda, Talita. Obrigada pela força nos momentos difíceis e de dúvidas...

Meu agradecimento especial à amiga Paty Karoll, pela ajuda, bom-papo e alegria durante a realização dos experimentos.

Aos amigos Eliana, Márcio Torsoni, Adriana, Vivian, Marcelo, Patrícia, Rodrigo, Marcel, Eduardo, Josenilson, Marciane, Maristela, Graziela, Andressa, Josiane, Alessandra, Raquel, Karen, Rosa, Cristine, Daniela Miti, Daniela Bertelli, Kellen, Eli, Brahma, Henrique, Cafu, Felipe, por todos os momentos divertidos, sérios e de aprendizado.

Aos professores Mário J.A. Saad e José Barreto Carvalheira, por suas conversas, ensinamentos e pelos momentos divertidos na hora do café.

Aos companheiros do biotério, Márcio, Luís, e sr. Zé, por sua ajuda, sua paciência e competência.

Aos companheiros sr. Lu e sr. Jósimo, por seu coleguismo e por tornar possível que nossos experimentos fossem bem realizados.

A Dra. Silvana Chiavegatto por me ajudar a concluir um importante passo em meu trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPES, pelo auxílio financeiro.

Obrigado!

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
1 - INTRODUÇÃO	14
2 - OBJETIVOS	24
3 - CAPÍTULO	26
Artigo: Inducible –NOS but not neuronal-NOS participate in the acute effect on TNF-α on hypothalamic insulin-dependent inhibition of food intake	27
4 - CONCLUSÃO GERAL	48
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
6 - APÊNDICE	57
Materiais e Métodos	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Angiotensina II	Angiotensina II
AKT/PKB	Proteína quinase B serino/treonina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendinitrilotetracético sal sódico
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina adenina mononucleotídeo
FOXO	Fator de transcrição da família Forkhead (box “other”) regulado por insulina
GRB2	Proteína ligadora do receptor para fator de crescimento
ICV	Intracerebroventricular
IκB	inibidor I kappa B de NF κ B
IKK	quinase I kappa B ativadora de NF κ B
i-NOS	Sintase do óxido nítrico induzível
IP	Intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK	transdutor de sinal Janus-Kinase (Janus activated kinase)
KO	Animais knockout
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitogênese na regulação do metabolismo e crescimento celular

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB	fator de transcrição nuclear factor kappa B
n-NOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NP40	Detergente não-iônico (Nonidet p-40)
PBS	Solução tampão de fosfato
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	p-methylsulphonyl fluoride
RAS	Proteína originalmente identificada como um oncogene, tem participação
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SHC:	Proteína de transdução de sinal Src homology collagen protein
SHP2:	Tirosina fosfatase
SOS	Fator ativador do Ras, apresenta homologia à Drosophila Son-of-seveless
STAT 3	Signal transducer activator of transcription
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
μCi	MicroCuri

RESUMO

Durante as últimas décadas tem se observado um aumento surpreendente na prevalência de obesidade e diabetes mellitus em populações de várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. Diversos estudos epidemiológicos apontam o consumo de dietas ricas em lípidos como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento dessas patologias. Em recente trabalho em nosso laboratório, foi demonstrado que a oferta de uma dieta rica em lípidos leva a uma maior expressão hipotalâmica de proteínas participantes de respostas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-1 β .

A citocina TNF α , agindo no hipotálamo, modula a ingestão alimentar e o gasto energético através de mecanismos incompletamente elucidados. Neste trabalho exploramos a hipótese de que, para modular a sinalização anorexigênica induzida por insulina no hipotálamo, o TNF α deve requerer a síntese de óxido nítrico. O TNF α ativa sinalização intracelular canônica no hipotálamo, com pico na concentração de 10^{-8} M. Esse efeito é acompanhado pela indução da expressão das formas neuronal e induzível da enzima NOS, em ambos os casos com pico em 10^{-12} M. Em adição, TNF α estimula a atividade catalítica de NOS. O pré-tratamento com TNF α em baixa dose (10^{-12} M) inibe a sinalização anorexigênica insulino-dependente. Esse efeito é abolido em camundongos iNOS mas não em camundongos nNOS knockout. Portanto, o efeito inibitório exercido pela baixa dose de TNF α sob a inibição da ingestão alimentar induzida por insulina depende, pelo menos em parte, da expressão de iNOS. Embora nNOS hipotalâmica seja induzida por TNF α , esta não participa da modulação TNF α -dependente dos sinais anorexigênicos da insulina.

ABSTRACT

Obesity has reached epidemic proportion in several regions of the world. General changes in life-style, including consumption of fat-rich food, are amongst the most important factors leading to an unprecedented increase in the prevalence of this disease. In a recently work on our laboratory, we showed that high fat feeding (hyperlipidic diet) induced the expression of several pro-inflammatory cytokines and inflammatory responsive proteins in hypothalamus, like TNF α , IL-2, IL-6 e IL-1 β . The cytokine TNF α , acting on the hypothalamus, modulates food intake and energy expenditure through mechanisms incompletely elucidated. Here, we explored the hypothesis that, to modulate insulin-induced anorexigenic signaling in hypothalamus, TNF- α would require the synthesis of NO. TNF- α activates canonical intracellular signaling in hypothalamus, peaking at 10⁻⁸ M. This is accompanied by the induction of expression of the inducible and neuronal forms of NOS, in both cases peaking at 10⁻¹² M. In addition TNF- α stimulates NOS catalytic activity. The pre-treatment with TNF- α at low dose (10⁻¹² M) inhibits insulin-dependent anorexigenic signaling. This effect is abolished in iNOS but not in nNOS knockout mice. Thus, the inhibitory effect exerted by low dose TNF- α upon the insulin-induced inhibition of food intake depends, at least in part, on the expression of iNOS. Although hypothalamic nNOS is induced by TNF- α it does not participate on TNF- α -dependent modulation of the insulin anorexigenic signals.

1 - INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade em várias regiões do mundo aumenta em um ritmo alarmante tendo como conseqüências o aumento do número de casos de diabetes mellitus tipo 2, de hipertensão arterial, dislipidemias, doenças cardiovasculares, entre outras. A obesidade é resultante da quebra do equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, prevalecendo o primeiro sobre o segundo. A adoção de padrões comportamentais que priorizam atividades profissionais sedentárias, e o consumo de dietas industrializadas, ricas em calorias, são os principais fatores ambientais associados ao progressivo aumento da prevalência desta doença. Entretanto, tais fatores somente levarão ao desenvolvimento do fenótipo de obesidade se atuarem sobre alguns determinantes genéticos ainda pouco conhecidos (Schwartz et al., 2000; Spiegelman and Flier, 2001).

A pandemia de obesidade que se observa hoje ocorre em paralelo a um rápido e substantivo incremento na caracterização de vias moleculares e de fenômenos fisiológicos necessários para a regulação do balanço de energia, gerando assim novos conhecimentos que oferecem possibilidades para o desenvolvimento futuro de terapias mais efetivas.

Nos últimos dez anos grandes avanços foram obtidos na caracterização dos mecanismos envolvidos na gênese da obesidade (Flier, 2004). O ponto de partida para tais avanços foi a caracterização do hormônio leptina pelo grupo do pesquisador Jeffrey Friedman de Nova Iorque (Friedman and Halaas, 1998). A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco em quantidade diretamente proporcional à massa total deste tecido. O principal sítio de ação da leptina são neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (Flier, 2004; Friedman and Halaas, 1998). Para alcançar tais neurônios a leptina atravessa a barreira hemato-encefálica utilizando um sistema saturável de transporte mediado por receptores (Schwartz et al., 2000). Pelo menos dois grupos distintos de neurônios estão presentes no núcleo arqueado, ambos possuindo receptores para leptina. São eles; neurônios produtores dos neurotransmissores NPY e AGRP (NPY/AGRPérgicos), e neurônios produtores dos neurotransmissores POMC e CART (POMC/CARTérgicos). Além de expressarem receptores para leptina, tais grupos de neurônios expressam também receptores para insulina, hormônio que desempenha um papel fundamental na modulação da ação da leptina (Schwartz et al., 2000).

Estudos realizados na segunda metade da década de 1990 revelaram que tanto a leptina quanto a insulina, mas principalmente ambos, agindo de forma combinada, têm a capacidade de inibir neurônios NPY/AGRPérgicos e ativar neurônios POMC/CARTérgicos (Carvalho et al., 2001; Schwartz et al., 2000; Torsoni et al., 2003). Neurônios NPY/AGRPérgicos encontram-se ativados durante períodos de jejum ou quando a massa total de tecido adiposo está reduzida. Nestas circunstâncias as conexões axonais entre neurônios do núcleo arqueado e neurônios dos núcleos paraventricular e hipotalâmico lateral levam à inibição da produção de neurotransmissores anorexigênicos e ativadores da termogênese (TRH e CRH) no núcleo paraventricular, e ativação da produção de neurotransmissores orexigênicos e inibidores da termogênese (orexina e MCH) no núcleo hipotalâmico lateral. O resultado desta regulação é o aumento da fome e a redução da termogênese. Por outro lado, em períodos pós-prandiais ou quando estoques de energia no tecido adiposo são satisfatórios, há aumento dos níveis sanguíneos de insulina e leptina, o que leva à inibição dos neurônios NPY/AGRPérgicos e ao estímulo dos neurônios POMC/CARTérgicos. O resultado é a inibição de neurônios do núcleo hipotalâmico lateral, produtores de orexina e MCH e o estímulo de neurônios do núcleo paraventricular, produtores de CRH e TRH. Ocorrerá então saciedade acompanhada de aumento da termogênese (Flier, 2004; Schwartz et al., 2000). Este complexo circuito fisiológico tem como função manter a homeostase do estoque de energia em resposta a variáveis nutricionais e a demandas de gasto energético.

Acredita-se hoje, que durante a evolução humana as pressões do meio, onde a baixa oferta de nutrientes foi uma regra, fizeram com que fossem selecionados genótipos poupadores de energia. Com a evolução dos meios de produção e estocagem de alimentos surgiram sociedades nas quais a oferta calórica muitas vezes suplanta as necessidades diárias médias do indivíduo. Num número relativamente grande de indivíduos, circuitos que suprimem o apetite e aumentam o gasto energético em resposta a fenômenos ambientais indutores de obesidade são insuficientemente robustos para prevenir a obesidade e suas complicações. Desta forma, explica-se em parte o aumento do número de obesos na população mundial.

Mecanismos de ação da insulina no hipotálamo e sua participação no controle da fome. O sinal molecular da insulina envolve a ativação de um receptor com atividade tirosina quinase intrínseca chamado receptor de insulina (IR). Este é uma glicoproteína da membrana plasmática composto por duas subunidades α e duas subunidades β ligadas por pontes dissulfeto. As subunidades α se ligam ao hormônio, enquanto as subunidades β possuem atividade catalítica tirosino-quinase. A ligação da insulina à subunidade α induz a atividade tirosina-quinase da subunidade β , a qual resulta na fosforilação do próprio IR (auto-fosforilação) e a seguir de pelo menos nove distintos substratos do receptor de insulina. Dentre estes, os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) foram bem caracterizados do ponto de vista estrutural e funcional (White, 1998). Tais substratos possuem vários resíduos tirosina passíveis de fosforilação pelo IR. Alguns destes resíduos agem como sítios de ligação para proteínas que contêm domínios SH2 que são formados por uma seqüência de aproximadamente 100 aminoácidos e constituem uma região molecular de ligação para proteínas fosforiladas, dentro de um contexto peptídico específico. Compõem este grupo de proteínas a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), o Grb 2 (growth factor receptor-bound protein 2) e a tirosina fosfatase Shp-2. A associação dessas proteínas aos IRSs permite sua ativação e a transdução do sinal da insulina, a qual pode ativar vias de sinalização distintas, sendo a p42/p44 MAP kinase e a PI3 kinase / Akt as mais bem caracterizadas (White, 1998).

A via da MAP quinase inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS ou Shc que interagem com a proteína Grb2, a qual está constitutivamente associada à Sos, proteína que troca GDP por GTP da Ras, ativando-a. A ativação da Ras requer a participação de Shp2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK, que levará à proliferação e diferenciação celulares.

A PI3 quinase é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose mediado pela insulina. Foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ativação da PI3 kinase (via sua associação com os IRSs) permite que essa enzima catalise a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol da membrana, produzindo fosfatidilinositol 3-fosfato, fosfatidilinositol 3,4-difosfato e fosfatidilinositol

3,4,5-trifosfato, o qual se torna um sítio de ligação para várias proteínas sinalizadoras, que se tornam ativas em resposta à fosforilação desses lipídeos de membrana. Uma das proteínas-alvo dessa enzima é a proteíno-quinase Akt/PKB, que quando ativa, fosforila proteínas que afetam o ciclo, crescimento e sobrevivência celular. A maioria dos alvos protéicos da Akt se tornam inibidos pelo evento da fosforilação. Por exemplo, a fosforilação do fator de transcrição FOXO inibe a transcrição de genes normalmente estimulados por este fator, como aqueles envolvidos no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. FOXO quando ativado estimula em última instância, a gliconeogênese no fígado, utilização de ácidos graxos no músculo, entre outros efeitos, aumentando a expressão dos genes da glicose 6 fosfatase, IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein1) e da PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) (Barthel, 2005).

Não existem diferenças estruturais entre o IR expresso em tecidos periféricos e no sistema nervoso central (Saltiel and Kahn, 2001). Assim, após ligar-se ao IR expresso no hipotálamo a insulina promove, através de modificação conformacional, a ativação de um sítio catalítico localizado na região que compreende as tirosinas 1145, 1150 e 1151 da sub-unidade β do receptor (White, 1997). Uma vez ativo, este sítio catalisa a fosforilação em tirosina dos resíduos 953, 960, 1316 e 1322 o que torna o receptor apto a dar continuidade à transdução do sinal (White, 1997). No hipotálamo, a insulina promove a ativação de pelo menos duas vias distintas de sinalização. A primeira, já discutida, depende do recrutamento e fosforilação em tirosina de substratos clássicos do IR, os IRSs (Carvalho et al., 2001; Torsoni et al., 2003). Aqui IRS-2 parece desempenhar um papel predominante mas não único, o que pode ser explicado em parte pela sua expressão preferencial em regiões que possuem maior número de neurônios que portam o IR (Torsoni et al., 2003). A ativação da PI3 kinase — via sua ligação aos IRS fosforilados -- (Carvalho et al., 2003; Torsoni et al., 2003) conecta o sinal da insulina ao controle do ritmo de disparos neuronais (Xu et al., 2005), o que é condicionado à ativação de canais de potássio ATP-dependentes (Plum et al., 2005). Através do controle do ritmo de disparos neuronais a insulina modula, em paralelo à leptina, a liberação de neurotransmissores nas sinapses efetoras (Plum et al., 2005). A segunda via depende da ativação da enzima JAK-2. Apesar de possuir atividade tirosina quinase intrínseca o IR é capaz de interagir com, e ativar a JAK-2 em vários tecidos, inclusive no hipotálamo

(Carvalho et al., 2001; Saad et al., 1996). Uma vez fosforilada e ativa a JAK-2 recruta e fosforila STAT-3 a qual conecta o sinal da insulina ao controle da transcrição de genes de neurotransmissores envolvidos com o controle da fome e da termogênese (Carvalho et al., 2001). É importante ressaltar, entretanto, que a ativação da transcrição gênica pela insulina através de STAT-3 só é efetiva na presença da leptina (Carvalho et al., 2001).

Efeito do TNF- α sobre o controle hipotalâmico da fome. O fator de necrose tumoral α é um dos mediadores dos sinais anorexigênicos hipotalâmicos que participam da indução das síndromes de caquexia presentes em estágios avançados de câncer e em severas doenças infecciosas (Mattys, 1997; Plata –Salaman, 2000). Os mecanismos envolvidos na modulação da ingestão alimentar e gasto energético dependentes de TNF α são pobremente caracterizados e devem envolver o controle da expressão de neurotransmissores hipotalâmicos (Bernardini, 1990; Wisse, 2003), estimulação *in situ* da expressão de outras citocinas, particularmente IL-1 β (Zhai, 1997; Bristulf, 1995) e ativação da transdução de sinal anorexigênico (leptin-like) no hipotálamo (Rizk, 2001).

O TNF- α age através de dois receptores distintos denominados TNFR1 e TNFR2 (MacEwan, 2002). Tais receptores apresentam algum grau de homologia na sua porção extracelular, sítio de ligação da citocina, porém na sua porção intracelular são completamente distintos, o que indica que cumprem funções particulares (MacEwan, 2002). TNF-R2 é expresso principalmente em células do sistema imune e parece desempenhar um papel na ontogênese e diferenciação de tecidos linfóides. Agindo através de TNFR1, TNF- α ativa substratos intracelulares que participam do controle da transcrição de genes de resposta inflamatória, modula proteínas participantes do controle de apoptose e regula respostas de crescimento e diferenciação celular (Gupta, 2002; MacEwan, 2002). Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização do TNF- α é a serina quinase JNK (Dempsey et al., 2003). Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1 (Dempsey et al., 2003). Entretanto, a atividade serina quinase da JNK pode atuar sobre outros substratos, inclusive os substratos tradicionais do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2

(Hotamisligil, 2003). Uma vez fosforilados em serina pela JNK a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via.

Outra via pró-inflamatória que pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via IKK/I κ B/NF- κ B (Shoelson et al., 2003). Esta via pode ser ativada pelo TNF- α , mas também por outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (Shoelson et al., 2003). A ativação de IKK promove a dissociação do complexo I κ B/NF κ B mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs o que compromete a transdução do sinal da insulina através desta cascata. A inibição da ativação da via IKK/I κ B/NF- κ B com uso do anti-inflamatório ácido acetil salicílico (AAS) reverte a resistência à insulina induzida por sinais pró-inflamatórios ou por sepse (Barreiro et al., 2004; Shoelson et al., 2003; Yuan et al., 2001).

Durante os últimos anos evidências experimentais e clínicas têm revelado que além de sua função primordial com órgão de estoque de energia, o tecido adiposo desempenha função endócrina e moduladora da resposta imune (Hotamisligil, 2000). A primeira função pode ser exemplificada pela ação da leptina que participa de mecanismos de sinalização que informam ao hipotálamo a respeito dos estoques periféricos de energia, e que permitem que se regule adequadamente as repostas de fome e termogênese (Flier, 2004). Além disso, outros hormônios como a adiponectina e a resistina carregam informações do tecido adiposo para outros órgãos metabolicamente ativos como músculo esquelético e fígado (Kershaw and Flier, 2004). A segunda função é exemplificada pela produção, pelo tecido adiposo, de citocinas pró-inflamatórias, numa quantidade diretamente proporcional à sua massa (Kershaw and Flier, 2004). Entre estas citocinas encontram-se TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que, como discutido acima, participam de complexos mecanismos que regulam negativamente a sinalização da insulina no próprio tecido adiposo, além de músculo e fígado (Hotamisligil, 2000; Kershaw and Flier, 2004). Tais achados estabeleceram uma ligação molecular entre o aumento da massa de tecido adiposo durante o desenvolvimento de obesidade e o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus.

Apesar dos importantes avanços obtidos na caracterização da resistência periférica à ação da insulina, pouco se avançou na compreensão dos mecanismos que levam ao desajuste do intrincado sistema de controle e acoplamento funcional entre fome e termogênese pelo sistema nervoso central. Partindo-se do paradigma que coloca a leptina e a insulina numa posição central como carreadores da informação a respeito dos níveis periféricos de estoques de energia, é possível que defeitos da transdução do sinal destes hormônios no hipotálamo, similares àqueles que participam do desencadeamento da resistência à ação da insulina em adiposo, fígado e músculo, possam concorrer para o desajuste no balanço entre controle da aquisição de energia e controle autônomo do gasto de energia. Em estudos recentemente realizados em nosso laboratório observou-se que, em ratos Wistar, o consumo de dieta rica em lípidos promove a indução de expressão uma série de genes de resposta inflamatória em hipotálamo. Dentre eles há um aumento significativo da expressão local de TNF- α e ativação da via da JNK. Tais fenômenos são acompanhados por resistência funcional e molecular à ação da insulina no hipotálamo a qual pode ser parcialmente revertida pelo tratamento de animais experimentais com um inibidor farmacológico da JNK (De Souza et al., 2005).

Participação do óxido nítrico no controle da fome. O óxido nítrico é um gás de tamanho suficientemente pequeno para passar diretamente através da membrana da célula-alvo; uma vez no seu interior, regula diretamente a atividade de proteínas intracelulares específicas. O NO é produzido pela sintase do óxido nítrico (NOS). Três isoformas de sintase do óxido nítrico foram indentificadas: eNOS ou tipo 3, das células endoteliais vasculares; bNOS ou nNOS ou tipo 1, das células cerebrais e iNOS ou tipo 2, de macrófagos e neutrófilos ativados. Todas são homodímeros com subunidades de 130-160 kDa; possuem locais de ligação para o NADPH, FAD e FMN próximo ao terminal carboxil (domínio redutase) e sítios de ligação para o grupo heme e tetrahydrobiopterina (BH₄) no terminal amino (domínio oxigenase). Os domínios redutase e oxigenase são ligados por uma região acopladora de calmodulina (CaM). A ocupação desse sítio facilita a transferência de elétrons de co-fatores no domínio redutase para o heme durante a produção de óxido nítrico (Ignarro, 1990) (Mayer et al., 1990) (Bredt and Snyder, 1990) (Forstermann and Kleinert, 1995). A arginina responsável pela produção do óxido nítrico através da NOS é transportada do sangue para dentro da célula pelo transportador de ácido

amino catiônico (CAT). O NO formado ativa a guanilil ciclase (GC) e ativa várias vias de sinalização reguladas por cGMP (Ignarro, 1990).

Estudos recentes revelaram que o óxido nítrico (NO) executa, além de suas clássicas funções de controle do tônus vascular e pressão arterial (Janero, 2001; Snyder, 1992), inúmeras outras funções fisiológicas, incluindo entre estas a modulação da ingestão alimentar (Calignano et al., 1993). O óxido nítrico parece ser modulado pelo neuropeptídeo Y (NPY) produzido pelo hipotálamo, potente agente orexigênico, que uma vez inibição com oligonucleotídeos antisense leva a um decréscimo na ingestão alimentar (Schaffhauser et al., 1997). O NPY, por sua vez, é inibido pelo aumento dos níveis de leptina. Camundongos ob/ob, deficientes para leptina, que apresentam hiperfagia e obesidade, possuem níveis aumentados de NPY. O receptor de leptina co-existe com o RNAm do pré-proneuropeptídeo Y no núcleo arqueado do hipotálamo do camundongo (Hakansson et al., 1996). Os camundongos ob/ob expressam níveis elevados de NOS no hipotálamo comparado com os controles magros (Morley et al., 1995). Existem ainda evidências de que alguns neurônios NPY são co-localizados com NOS (Morley et al., 1995). Outros estudos revelam ainda que a administração crônica de leptina inibe a atividade de NOS no hipotálamo e que o NPY administrado icv aumenta a atividade de NOS no hipotálamo (Morley et al., 1999). Assim, revelam-se três linhas de evidência de que o óxido nítrico possa ser um importante regulador da fome. Primeiro, a inibição de NOS resulta em decréscimo na ingestão alimentar, tanto de forma aguda como crônica (Calignano et al., 1993). Segundo, alterações no estado de alimentação de roedores resulta em alterações nos níveis de NOS no hipotálamo (Ueta et al., 1995). E, terceiro, os camundongos ob/ob possuem níveis elevados de NOS e de RNAm e a administração de um antagonista de NOS resulta em decréscimo acentuado na ingestão alimentar e perda de peso nos ob/ob (Morley and Flood, 1994; Morley et al., 1995).

Estudos prévios demonstram que inibidores da NOS, tais como o L-NAME (N-nitro-L-arginine-metil-ester) reduzem a ingestão alimentar em animais normais e em obesos (Morley and Flood, 1992; Squadrito et al., 1994; Yamada et al., 1996). Inibidores da NOS também inibem a hiperfagia induzida por morfina (Czech, 1998). Por fim, Squadrito et al. (Squadrito et al., 1994) demonstraram que inibidores de NOS induzem anorexia por modulação dos níveis na serotonina no sistema nervoso central.

O NO é uma importante via final comum para muitos peptídeos com ação orexigênica ou anorexigênica. Isso pode ser visto, por exemplo, nos efeitos exercidos por estes peptídeos sobre os níveis de NOS, particularmente no hipotálamo, e pela inibição do efeitos destes peptídeos por inibidores de óxido nítrico, como o L-NAME (Gaskin et al., 2003). Estes estudos mostram ainda que os níveis hipotalâmicos de NOS são aumentados pela grelina, um outro peptídeo orexigênico, e diminuídos por vários peptídeos anorexigênicos, incluindo a leptina (Gaskin et al., 2003).

Uma série de estudos revela que o TNF- α pode ativar a transcrição gênica e incrementar a expressão de NOS em vários tecidos (Murata et al., 1994) (Jiang et al., 1995). Aparentemente, a isoforma i-NOS é aquela que sofre regulação mais exuberante pelo TNF- α , entretanto, parte deste efeito pode ocorrer por mecanismo indireto, dependendo da indução de outras citocinas em resposta ao TNF- α (Adamson and Billings, 1993; Nicolson et al., 1993). Alguns trabalhos mostram ainda que o tratamento com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), leva à produção de NO em astrócitos e em células da micróglia, tal fenômeno sendo dependente da capacidade do LPS de estimular a produção das citocinas IL-1 β e TNF- α , o que culmina com a estimulação da isoforma i-NOS (Romero et al., 1996).

Diante disso, decidimos estudar a participação da citocina TNF- α na regulação das isoformas neuronal e induzível da NOS no hipotálamo de ratos. Como dito anteriormente, os níveis desta citocina encontram-se aumentados durante a obesidade, gerando certos distúrbios fisiológicos. Ainda não há relatos na literatura de que o TNF α poderia estar atuando nesta via no hipotálamo e controlando a expressão do óxido nítrico, possivelmente contribuindo para o aumento da ingestão alimentar observado em obesos. Estudos mais detalhados podem fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos no controle da ingestão e possivelmente indicar alternativas para abordagens terapêuticas mais efetivas para o tratamento da obesidade.

2 - OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do TNF- α sobre a expressão de i-NOS e n-NOS no hipotálamo;
- Avaliar o efeito do TNF- α sobre a atividade de NOS no hipotálamo;
- Avaliar a participação de TNF- α , de iNOS e nNOS sobre o controle da atividade anorexigênica da insulina .

3 - CAPÍTULO

Inducible-NOS but not neuronal-NOS participate in the acute effect of TNF- α on hypothalamic insulin-dependent inhibition of food intake

Juliana C. Moraes^a, Maria E. Amaral^a, Paty K. Picardi^a, Vivian C. Calegari^a, Talita Romanatto^a, Marcela Bermúdez-Echeverry^b, Silvana Chiavegatto^c, Mario J. Saad^a, Licio A. Velloso^{a*}

^aDepartment of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, Brazil

^bDepartment MEF-Physiology, School of Odontology, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^cDepartment and Institute of Psychiatry and Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author: DCM-FCM, UNICAMP, 13084-970, Campinas SP, Brazil

FAX + 55 19 37888950, email lavelloso@fcm.unicamp.br

Abbreviations: iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha

Abstract

TNF- α acts on the hypothalamus modulating food intake and energy expenditure through mechanisms incompletely elucidated. Here, we explore the hypothesis that, to modulate insulin-induced anorexigenic signaling in hypothalamus, TNF- α requires the synthesis of NO. TNF- α activates signal transduction through JNK and p38 in hypothalamus, peaking at 10^{-8} M. This is accompanied by the induction of expression of the inducible and neuronal forms of NOS, in both cases peaking at 10^{-12} M. In addition, TNF- α stimulates NOS catalytic activity. Pre-treatment with TNF- α at a low dose (10^{-12} M) inhibits insulin-dependent anorexigenic signaling, and this effect is abolished in iNOS but not in nNOS knockout mice.

Keywords: Cytokine; Food intake; Insulin; Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Tumor necrosis factor

1 - Introduction

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is one of the mediators of the hypothalamic anorexigenic signals that participate in the induction of the cachexia syndromes present in advanced stage cancer and in severe infectious diseases [1,2]. The mechanisms involved in TNF- α -dependent modulation of food intake and energy expenditure are poorly characterized but may involve the control of hypothalamic neurotransmitter expression [3,4], *in situ* stimulation of the expression of other cytokines, particularly IL-1 β [5,6], and the activation of anorexigenic leptin-like signal transduction in the hypothalamus [7].

In addition, TNF- α and other pro-inflammatory proteins produced by the adipose tissue during obesity participate in the genesis of peripheral insulin resistance by activating serine kinases that hamper insulin signal transduction through the IRS proteins [8]. Based on this fact, it has been proposed that the adipokines act as a mechanistic link between obesity and type 2 diabetes mellitus. This suspicion was enforced by recent studies showing that: *a*, the consumption of a high fat diet, which is, *per se*, one of the most important environmental factors leading to obesity, induces the hypothalamic expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, and inhibits insulin and leptin signaling through intracellular mechanisms related to inflammatory signal transduction [9-11]; and *b*, acute TNF- α treatment increases the sequestration of insulin by the brain [12]. As a consequence, the anorexigenic effects of both hormones may be stalled, predisposing to obesity.

In this context, we can assume that TNF- α and other cytokines play important roles in the control of body energy stores. In some cases they favor energy depletion, whilst in other cases they favor the increase in body fat. Much of these effects seem to depend on cytokine signaling in the hypothalamus.

In peripheral tissues and in isolated astrocytes, TNF- α is capable of promoting nitric oxide (NO) production mostly through the activation of expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) [13-15]. Since NO, acting in the hypothalamus, is reported to be a modulator of food intake [16,17], we hypothesized that, in order to modulate insulin action in hypothalamus, TNF- α requires the activation of NOS and the synthesis of NO. Therefore, we decided to evaluate the participation of the inducible and neuronal forms of NOS on TNF- α -dependent modulation of food intake.

2 - Materials and methods

2.1 - Antibodies, chemicals and buffers

Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, bovine serum albumin (fraction V), N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), and angiotensin II were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), 125 I-protein A was from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA), and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 μ m) was from Amersham (Aylesbury, UK). Sodium thiopental (Amytal) and human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN, USA). For determination of NOS activity, silica gel thin layer chromatographic plates were obtained from the Fisher Chemical Company (Pittsburg, PA, USA). β NADPH, 5,6,7,8 tetrahydrobiopterin dihydrochloride, NP40, pepstatin, arginase inhibitor [S-(+)-2-amino-S-(iodocetamido) pentanoic acid], calmodulin, iodocetamide, EDTA, and niacinamide were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). 14 C -L-arginine (300mCi/mmol, 100 μ Ci/ml) was obtained from Amersham (Aylesbury, UK). Mouse recombinant TNF- α was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Anti-phospho-JNK (mouse monoclonal, recognizing JNK phosphorylated at Thr 183 and Tyr 185, sc-6254), phospho-p38 (mouse monoclonal, recognizing p38 phosphorylated at Tyr 182, sc-7973), c-Fos (rabbit polyclonal, sc-7202), c-Jun (rabbit polyclonal, sc-1694), nNOS (rabbit polyclonal, sc-8309), and iNOS (mouse monoclonal, sc-7271) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho-Akt (rabbit polyclonal, recognizing Akt phosphorylated at Ser 473, #05-736) was purchased from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA) and phospho-FKHR (FOXO1-rabbit polyclonal, recognizing FOXO1 phosphorylated at Ser 256, #9461) was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

2.2 - Experimental animals

Eight-week old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and the iNOS knockout mice and their respective wild type control (C57Bl/6J) were from the University of Campinas Central Animal Breeding Center. The nNOS knockout mice and their respective wild type control (C57Bl/6J) were from a breeding colony established at Tropical Medicine Institute, University of São Paulo. The iNOS knockout mice founders were purchased from the Jackson Laboratory and are derived originally from the colony established at the University of Virginia [18]. The nNOS knockout mice were kindly donated by Ted M. Dawson from the Johns Hopkins University [19] and were produced by homologous recombination, as originally described [20]. The experimental animals were maintained on a 12 h-light/dark cycle and allowed *ad libitum* access to standard rodent chow and water. Food was withdrawn 6 h before the experiments. All experiments were conducted in accord with the principles and procedures described by the NIH Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas Ethical Committee.

2.3 - ICV cannulation

Rats and mice were stereotaxically instrumented using a Stoelting stereotaxic apparatus, according to a method previously described [21]. The correct location of the cannula was tested one week after cannulation by the evaluation of the drinking response elicited by ICV angiotensin II [22]. Stereotaxic coordinates were: antero-posterior 0.2 mm/lateral 1.5 mm/depth 4.0 mm for rats; and antero-posterior 0.15 mm/lateral 0.7 mm/depth 2.2 mm for mice.

2.4 - Protocol for food ingestion determination

ICV cannulated rats were food deprived for 6 h (from 12 to 18 h) and at 18 h were ICV treated with insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M), TNF- α (2.0 μ l, 10^{-6} 10^{-8} 10^{-10} 10^{-12} 10^{-14} M), or saline (2.0 μ l). Food ingestion was determined over the next 12 h. ICV cannulated mice

were food deprived for 6 h. At 18 h, mice were treated with insulin (1.0 μ l, 10^{-6} M), TNF- α (10^{-8} and 10^{-12} M), L-NAME (1.0 μ l, 10^{-8} M) or saline. Food ingestion was determined over the next 12 h. Mice were also evaluated for mean daily spontaneous food intake. For this, non-ICV-cannulated mice were placed in metabolic cages and food intake was determined daily at 8 h. For each animal the determinations were performed for four consecutive days.

2.5 - Tissue extraction, immunoblotting and immunoprecipitation

ICV cannulated rats and mice were anesthetized and acutely treated with saline (2.0 μ l), insulin or TNF- α . After 5 - 180 min, according to each experiment, the hypothalami were dissected and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9,000 x g in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 2.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against c-Fos at 4°C overnight, followed by SDS/PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-c-Jun. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho-JNK, phospho-p38, c-Fos, c-Jun, iNOS, nNOS, phospho-Akt and phospho-FKHR (FOXO1) antibodies.

2.6 - Quantification of NOS activity

As previously described [23,24], the hypothalami from Wistar rats were homogenized in phosphate-buffered-saline (PBS) (PBS- isotonic PBS, pH 7.4), containing 1% NP₄₀, 2.0 mM PMSF, 1.0 μ M pepstatin, 20 mM EDTA, 3.7 mg/ml iodoacetamide.

The samples were left on ice for 30 min and spun for 20 min at 20,000 x g in a micro centrifuge. The crude supernatant was aspirated and protein was estimated using a Detergent Compatible protein assay from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). For each NOS assay, 30 µg of sample from the tissue extracts was added to the reaction mixture (50 µl), which consisted of 33.3 mM Pipes-NaOH, pH 7.0, 0.12 mM NADPH, 0.4 mM CaCl₂, 0.33 µg/ml calmodulin, 0.33 mM DTT, 0.33 mM EDTA, 1.0 mM niacinamide, 50 µM tetrahydrobiopterin, 0.17 mg/ml arginase inhibitor and 0.15 µl of ¹⁴C -L-arginine. The incubation was carried out at 37° C for specified time periods. The NOS reaction was terminated by adding 2.5 volumes of cold methanol. The samples were left on ice for 20 min and centrifuged at 20,000 x g for 10 min using a microcentrifuge. The liquid was then directly spotted onto a silica gel TCL plate, air dried, and subjected to chromatography. For this, the solvent used was ammonium hydroxide: chloroform: methanol:water (2:0.5:4.5:1). Chromatography was performed until the solvent front reached at least 10 cm from the origin. After chromatography, the radioactivity in the TCL plates was counted using a radioactivity scanner. The amount of ¹⁴C citrulline that corresponded to each of the samples was counted and compared with that of the zero time point.

2.7 - Statistical analysis

Specific protein bands present in the blots were quantified by densitometry. Mean values ± SEM obtained from densitometric scans and mean ± SEM values for all remaining parameters evaluated in the study were compared utilizing Student's *t*-test for paired samples or by repeat-measure analysis of variance (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate. A *p*<0.05 was accepted as statistically significant.

3 - Results and discussion

The cytokine TNF-α acts through at least two distinct receptors, TNF-R1 and TNF-R2 [25]. TNF-R2 is expressed mostly in cells of the immune system and is thought to play an important role in the ontogenesis and differentiation of lymphoid tissues [25],

whilst TNF-R1 is widely distributed and mediates TNF- α signaling towards activation of pro-inflammatory responses, control of gene expression, regulation of apoptosis, and production of NO, amongst a number of other functions [26]. Both types of receptors have been found in the central nervous system, including the hypothalamus [27]. However, little is known about their specific functions in this site. In fact, no previous study has evaluated the capacity of TNF- α to activate pro-inflammatory signal transduction in the hypothalamus of rodents. Therefore, we started by determining the time-course and dose-response effects of ICV injected TNF- α upon JNK and p38 signaling, two of the most important pathways activated by TNF- α . As shown in Figure 1A, TNF- α induces the phosphorylation-activation of JNK, starting at 5 min and reaching a peak at 10 min. This effect was already detected at a dose as low as 10^{-10} M and reached a peak at 10^{-8} M (Fig. 1B). In addition, TNF- α induced the phosphorylation-activation of p38, peaking at 10 min (Fig. 1C). These effects were accompanied by a time dependent induction of the transcription factor AP1, which started at 5 min and was maintained for at least 15 min (Fig. 1D). Finally, the effects of TNF- α resulted in the induction of expression of c-Fos, detected at 60 min (Fig. 1E) and of c-Jun, detected at 15 min (Fig. 1F), and lasting for at least 60 min.

Next, we evaluated the capacity of TNF- α to induce the catalytic activity of NOS in hypothalamus. Although TNF- α dependent activation of NOS activity has been widely characterized in peripheral tissues [14,28], no previous study has examined this property in the hypothalamus. For this, rats were ICV cannulated and treated with $2.0 \mu\text{l}$ 10^{-8} M TNF- α . Hypothalami were obtained at 0, 10 and 30 min and samples were prepared for determination of NOS activity using a chromatographic method that allows the measurement of citrulline production. As shown in Figure 2, TNF- α was capable of rapidly inducing the catalytic activity of NOS, which was already detected at 10 min and was still present at 30 min. In other tissues, the ability of TNF- α to induce NOS activity is directly related to its capacity to induce the expression of NOS isoforms, mostly iNOS [14,15,28,29]. Therefore, we employed an immunoblot assay, with isoform-specific antibodies, to evaluate the effect of TNF- α on the hypothalamic expression of nNOS and iNOS. As depicted in Figures 3A and 3B, both low dose (10^{-12} M) and high dose (10^{-8} M)

TNF- α , respectively, are capable of inducing the rapid expression of nNOS in this anatomical territory. In both cases, significant increases of the amount of nNOS protein were detected at 10 min and were still present at 120 min. Interestingly, the greatest effect of TNF- α upon hypothalamic nNOS expression was obtained with the dose of 10^{-12} M (Fig. 3C). Similarly, TNF- α was also capable of inducing the expression of iNOS in hypothalamus. This phenomenon was detected using either a low (10^{-12} M) (Fig. 3D) or a high (10^{-8} M) (Fig. 3E) dose of TNF- α , and was somewhat delayed as compared with the expression of nNOS, starting only at 30 min and lasting for at least 120 min. Once more, the greatest effect of TNF- α occurred with a dose of 10^{-12} M (Fig. 3F).

Since TNF- α is capable of inducing the expression and activity of NOS, and considering that NO has a remarkable effect on food intake [30-32], we decided to evaluate whether, at least part of the modulatory effect exerted by TNF- α on the hypothalamic insulin action on feeding would depend on the activation of NOS. First, we determined the effect of a previous dose of TNF- α on insulin-inhibited food intake. For this, rats were ICV cannulated and after the recovery period, were treated with saline, insulin alone, 10^{-12} M TNF- α alone, 10^{-8} M TNF- α alone, 10^{-12} M TNF- α followed by insulin, or 10^{-8} M TNF- α followed by insulin. As shown in Figure 4A, insulin alone promoted a reduction of 45% on food intake, TNF- α at the concentration of 10^{-12} M exerted no effect on food intake, whilst at the dose of 10^{-8} M led to a reduction of 20% on food intake. Interestingly, the pre-treatment with 10^{-12} M TNF- α produced an inhibitory effect on insulin action such that food intake was only 18% lower than in the control. Finally, the pre-treatment with 10^{-8} M TNF- α produced no effect on the hypothalamic action of insulin on feeding. To evaluate if the pharmacological inhibition of NOS would exert any modulatory effect on TNF- α dependent control of insulin action on feeding, C57Bl/6J mice were ICV pre-treated with L-NAME and then treated with TNF- α and insulin. As depicted in Figure 4B, L-NAME completely abolished the inhibitory effect of TNF- α 10^{-12} M upon insulin-inhibited food intake, suggesting that most of the effect of this dose of TNF- α on insulin action is mediated through NOS. Next, to examine the participation of the NOS isoforms in TNF- α dependent modulation of the insulin action on feeding we used knockout mice for the nNOS and iNOS isoforms. The mean daily food intakes of the

knockout strains were not different from that of the control (Fig. 4C). In addition, in all three strains of mice analyzed (C57Bl/6J, nNOS knockout and iNOS knockout) insulin exerted a similar effect on food intake, promoting an inhibition of approximately 50% (Figs. 4B, 4D and 4E). With regard to the effects of the pre-treatment with TNF- α on the action of insulin on feeding, control and nNOS knockout mice had similar responses, presenting results proportional to those seen in rats. Thus, 10^{-12} M TNF- α inhibited, while 10^{-8} M TNF- α exerted no effect on insulin action (Figs. 4B and 4D). However, in iNOS mice the results were contrasting. In these mice, the pre-treatment with 10^{-12} M TNF- α exerted no inhibitory effect on the insulin action on food intake (Fig. 4E). In addition, the pre-treatment with 10^{-8} M TNF- α enhanced the inhibitory effect of insulin (Fig. 4E).

Finally, to determine whether the transduction of the hypothalamic insulin signal towards Akt and FOXO1 would be somehow modified in NOS isoform specific knockout mice, ICV cannulated mice were treated with saline or insulin and protein extracts obtained from hypothalami were employed in immunoblot experiments. As shown in Figures 4F and 4G, no differences in insulin-stimulated phosphorylation of Akt and FOXO1 were detected in nNOS and iNOS knockout mice as compared with control. In iNOS knockout mice, the basal phosphorylation state of both Akt and FOXO1 were higher than in control and nNOS knockout mice. However, upon pre-treatment with TNF- α , control and nNOS knockout mice presented a significant inhibition of insulin-induced phosphorylation of Akt and FOXO1, a phenomenon not observed in iNOS knockout mice (Figs. 4G and 4F).

As a whole, this study shows that TNF- α is capable of activating signal transduction through pro-inflammatory pathways in the hypothalamus. In addition, TNF- α is demonstrated to be capable of activating nNOS and iNOS protein expression in hypothalamus, which is accompanied by increased NOS catalytic activity. The optimal dose for TNF- α to activate signal transduction through JNK is somewhat higher than the optimal dose required for induction of expression of the NOS isoforms, suggesting that the TNF- α -induced expression of iNOS and nNOS occurs through a pathway other than JNK. The pathways used by TNF- α to induce NOS expression and activity are controversial.

Initially it was suggested that cytokines, including TNF- α , regulate NOS activity only by controlling the intracellular levels of tetrahydrobiopterin [33]. However, it was later seen that TNF- α can also control iNOS gene expression through protein tyrosine kinase signal transduction [34]. More recently, the participation of p38 in the TNF- α -induced expression of iNOS was suggested by indirect methods [35]. Interestingly, the effect of TNF- α upon food intake is also dose dependent. When acting alone, a high dose of TNF- α inhibits food intake, while no regulation is produced by a low dose. Conversely, only a low dose of TNF- α is capable of hampering the effect of insulin on feeding. The defective expression of iNOS, but not of nNOS, completely abolishes the effect of TNF- α upon insulin action. This phenomenon is independent of the modulation of insulin signal transduction through Akt and FOXO1.

Taken together, the results of this investigation and of previous studies [1-3,9] suggest that TNF- α acts in the hypothalamus producing different effects depending on its local concentrations. At high levels, it stimulates canonical pro-inflammatory signal transduction, which is accompanied by an inhibitory effect on food intake. This effect is not incremented by insulin. Conversely, at low level there is no effect of TNF- α upon classical pro-inflammatory signaling but there is a remarkable effect on NOS isoforms expression and on NOS activity. This is accompanied by an inhibitory effect on hypothalamic insulin action, but by no independent effect on food intake. At this point we are unable to define if the effects herein reported are solely due to an increased local production of NO or are dependent on the presence of NO-derived metabolites such as peroxynitrite, as reported in other experimental condition of inflammation in the central nervous system [36]. Nevertheless, since no regulation of insulin signal transduction was seen in iNOS deficient mice we suspect that the NO produced by iNOS in response to TNF- α confronts the action of insulin through a direct effect on neurotransmitter production or release. In this regard, it has been previously shown that NO may impair hypothalamic serotonin release and increase dopaminergic activity, both leading to the modulation of food intake [30-32]. In the presence of pro-inflammatory activation, such as during high dose TNF- α stimulation, the inhibitory effect on insulin action is lost probably due to the engagement of mechanisms that have not been completely elucidated, which participate in the classical anorexigenic effects of this cytokine [1,2].

Acknowledgements. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP – ClimaBio). We thank Dr. N. Conran for English grammar editing.

References

- [1] Matthys, P. and Billiau, A. (1997) *Nutrition* 13, 763-70.
- [2] Plata-Salaman, C.R. (2000) *Nutrition* 16, 1009-12.
- [3] Bernardini, R., Kamilaris, T.C., Calogero, A.E., Johnson, E.O., Gomez, M.T., Gold, P.W. and Chrousos, G.P. (1990) *Endocrinology* 126, 2876-81.
- [4] Wisse, B.E., Schwartz, M.W. and Cummings, D.E. (2003) *Ann N Y Acad Sci* 994, 275-81.
- [5] Zhai, Q.H., Futrell, N. and Chen, F.J. (1997) *J Neurol Sci* 152, 119-24.
- [6] Bristulf, J. and Bartfai, T. (1995) *Neurosci Lett* 187, 53-6.
- [7] Rizk, N.M., Stammsen, D., Preibisch, G. and Eckel, J. (2001) *Endocrinology* 142, 3027-32.
- [8] Hotamisligil, G.S. (1999) *J Intern Med* 245, 621-5.
- [9] De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J. and Velloso, L.A. (2005) *Endocrinology* 146, 4192-9.
- [10] Munzberg, H., Flier, J.S. and Bjorbaek, C. (2004) *Endocrinology* 145, 4880-9.
- [11] Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjorbaek, C. and Flier, J.S. (2004) *Nat Med* 10, 734-8.
- [12] Cashion, M.F., Banks, W.A. and Kastin, A.J. (1996) *Horm Behav* 30, 280-6.
- [13] Romero, L.L., Tatro, J.B., Field, J.A. and Reichlin, S. (1996) *Am J Physiol* 270, R326-32.
- [14] Jiang, H., Stewart, C.A. and Leu, R.W. (1995) *Immunobiology* 192, 321-42.
- [15] Nicolson, A.G., Haites, N.E., McKay, N.G., Wilson, H.M., MacLeod, A.M. and Benjamin, N. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1269-74.

- [16] Schaffhauser, A.O., Stricker-Krongrad, A., Brunner, L., Cumin, F., Gerald, C., Whitebread, S., Criscione, L. and Hofbauer, K.G. (1997) *Diabetes* 46, 1792-8.
- [17] Morley, J.E., Alshaher, M.M., Farr, S.A., Flood, J.F. and Kumar, V.B. (1999) *Peptides* 20, 595-600.
- [18] Laubach, V.E., Shesely, E.G., Smithies, O. and Sherman, P.A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10688-92.
- [19] Chiavegatto, S., Dawson, V.L., Mamounas, L.A., Koliatsos, V.E., Dawson, T.M. and Nelson, R.J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1277-81.
- [20] Huang, P.L., Dawson, T.M., Brecht, D.S., Snyder, S.H. and Fishman, M.C. (1993) *Cell* 75, 1273-86.
- [21] Torsoni, M.A., Carvalheira, J.B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M.A., Saad, M.J. and Velloso, L.A. (2003) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E216-23.
- [22] Johnson, A.K. and Epstein, A.N. (1975) *Brain Res* 86, 399-418.
- [23] Gaskin, F.S., Farr, S.A., Banks, W.A., Kumar, V.B. and Morley, J.E. (2003) *Peptides* 24, 913-8.
- [24] Kumar, V.B., Bernardo, A.E., Alshaher, M.M., Buddhiraju, M., Purushothaman, R. and Morley, J.E. (1999) *Anal Biochem* 269, 17-20.
- [25] Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. (2001) *Cell* 104, 487-501.
- [26] Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- [27] Nadeau, S. and Rivest, S. (1999) *Neuroscience* 93, 1449-64.
- [28] Murata, J., Corradin, S.B., Janzer, R.C. and Juillerat-Jeanneret, L. (1994) *Int J Cancer* 59, 699-705.
- [29] Adamson, G.M. and Billings, R.E. (1993) *Toxicol Appl Pharmacol* 119, 100-7.

- [30] Iuras, A., Telles, M.M., Bertoncini, C.R., Ko, G.M., de Andrade, I.S., Silveira, V.L. and Ribeiro, E.B. (2005) *Regul Pept* 124, 145-50.
- [31] Calignano, A., Persico, P., Mancuso, F. and Sorrentino, L. (1993) *Eur J Pharmacol* 231, 415-9.
- [32] Morley, J.E. and Flood, J.F. (1994) *Am J Physiol* 266, R164-8.
- [33] Rosenkranz-Weiss, P., Sessa, W.C., Milstien, S., Kaufman, S., Watson, C.A. and Pober, J.S. (1994) *J Clin Invest* 93, 2236-43.
- [34] Miller, D.R., Collier, J.M. and Billings, R.E. (1997) *Am J Physiol* 272, G207-14.
- [35] Fabrizi, C., Silei, V., Menegazzi, M., Salmona, M., Bugiani, O., Tagliavini, F., Suzuki, H. and Lauro, G.M. (2001) *J Biol Chem* 276, 25692-6.
- [36] Raber, J., Sorg, O., Horn, T.F., Yu, N., Koob, G.F., Campbell, I.L. and Bloom, F.E. (1998) *Brain Res Brain Res Rev* 26, 320-6.

Legends for the figures

Figure 1. *TNF- α signal transduction in hypothalamus.* Anesthetized rats were ICV treated with 2.0 μL , 10^{-8} M TNF- α (A, C-F) or at the concentrations depicted in the figure (B). After the time frames, as depicted in the figures (A, C-F) or after 10 min (B), hypothalami were obtained for protein extract preparation. For direct immunoblot analysis (A-C, E, F), samples containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with specific antibodies to phospho-JNK (p-JNK) (A, B); phospho-p38 (p-p38) (C); c-Fos (E) and c-Jun (F). For immunoprecipitation followed by immunoblot, samples containing 2.0 mg total protein were submitted to immunoprecipitation (IP) with antibodies to c-Fos (D); immunoprecipitates were collected with Protein A-Sepharose and separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with antibodies to c-Jun. Specific bands were quantified by densitometric analysis. In all experiments, $n = 4$; * $p < 0.05$ vs. time 0 (A, C-F) or vs. concentration 0 (B). Results are presented as mean \pm SEM.

Figure 2. *TNF- α - induced activation of nitric oxide synthase catalytic activity.* Anesthetized rats were ICV treated with 2.0 μL , 10^{-8} M TNF- α . After the time points depicted in the figure, the hypothalami were obtained for extract preparation. The reaction was carried out as described under *Materials and methods*. Citrulline was separated by TLC and the radioactivity in the TCL plates was counted using a radioactivity scanner. The amount of ^{14}C citrulline that corresponded to each of the samples was counted and compared with the zero time point. Results are presented as mean \pm SEM; $n = 4$; * $p < 0.05$ vs. time 0 min.

Figure 3. *Induction of nNOS and iNOS expression by TNF- α .* Anesthetized rats were ICV treated with 2.0 μL , 10^{-12} M (A and D), 10^{-8} M (B and E) TNF- α or at the concentrations depicted in the figures (C and F). After the time points depicted in the figures (A, B, D and E) or after 30 min (C and F), hypothalami were obtained for protein extract preparation. Samples containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with specific antibodies to nNOS (A-C) or iNOS (D-F). Specific bands were quantified by densitometric analysis. In all experiments,

n = 4; *p<0.05 vs. time 0 (A, B, D and E) or vs. concentration 0 (C and F). Results are presented as mean ± SEM.

Figure 4. *Role played by NOS isoforms in the control of food intake and insulin signal transduction.* Twelve-hours food intake determination was performed in ICV cannulated Wistar rats (A), C57Bl/6 (WT) mice (B), nNOS knockout mice (D) and iNOS knockout mice (E). For this, animals were food deprived from 12 to 18 h and then treated with saline (S), insulin (I) (10^{-6} M), TNF- α (T) (10^{-12} or 10^{-8} M), L-NAME (L) (10^{-8} M), insulin (10^{-6} M) plus TNF- α (10^{-12} or 10^{-8} M) or L-NAME (10^{-8} M) plus insulin (10^{-6} M) plus TNF- α (10^{-12} or 10^{-8} M) (volumes were 2.0 μ l for rats and 1.0 μ l for mice). Food was reintroduced and spontaneous ingestion was determined over the next 12 h. Twenty four hours spontaneous food intake was determined for C57Bl/6 (WT), nNOS knockout mice and iNOS knockout mice (C). Insulin signal transduction towards Akt (F) and FOXO1 (G) was determined in C57Bl/6 (WT), nNOS knockout mice and iNOS knockout mice. For this, anesthetized mice were ICV treated with 1.0 μ L saline (-), 10^{-6} M insulin (+) or 10^{-12} M TNF- α plus insulin (+ +) and, after 10 min, hypothalami were obtained for protein extract preparation. Samples containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with specific antibodies to phospho-Ser⁴⁷³ Akt (F) or phospho-Ser²⁵⁶ FOXO1 (G). Specific bands were quantified by densitometric analysis. In all experiments, n = 4. In A-E, *p<0.05 vs. saline treated (S); §p<0.05 vs. insulin treated (I). In F-G, *p<0.05; n.s., not significant. Results are presented as mean ± SEM.

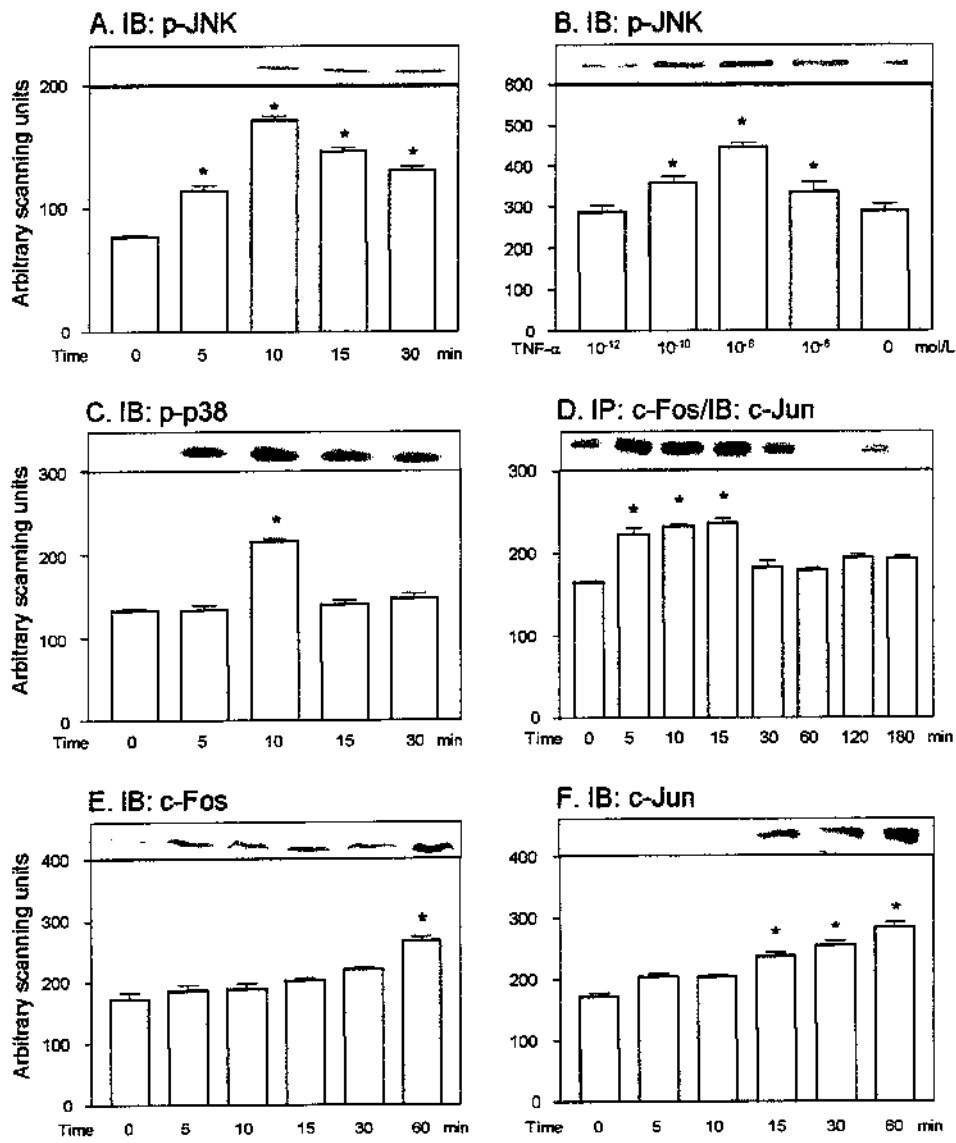


Figure 1

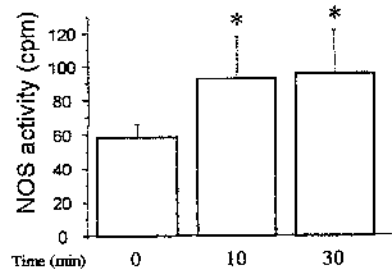


Figure 2

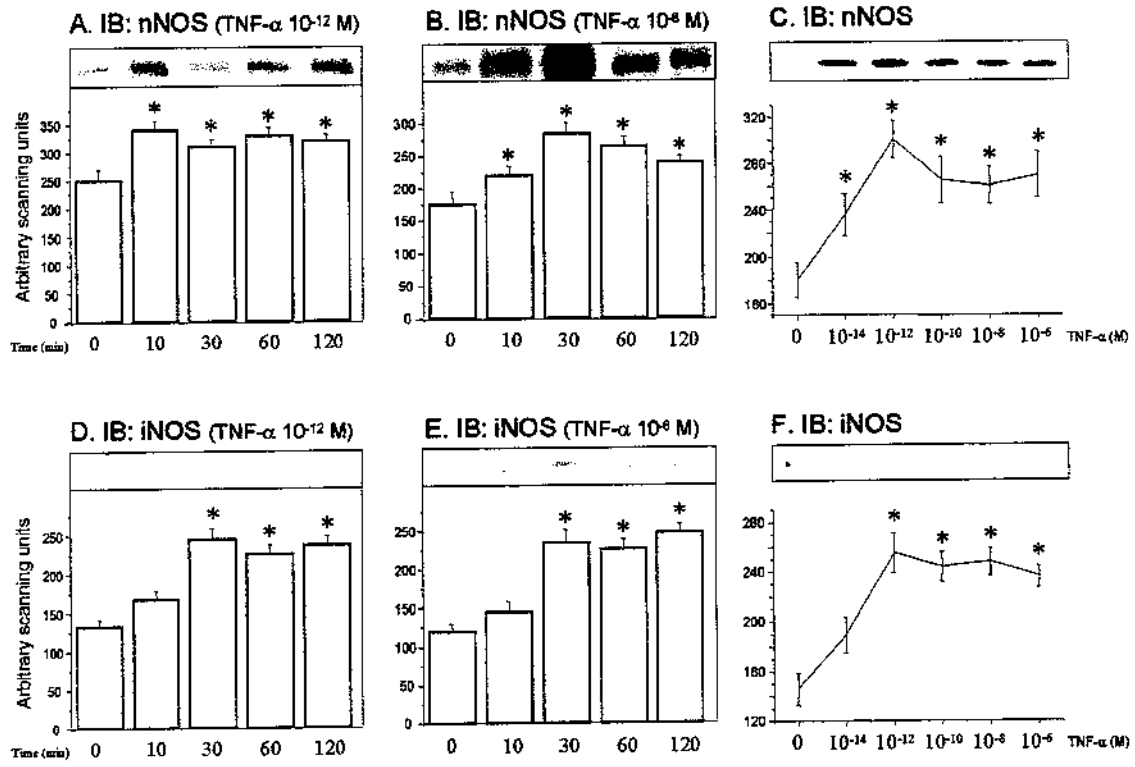
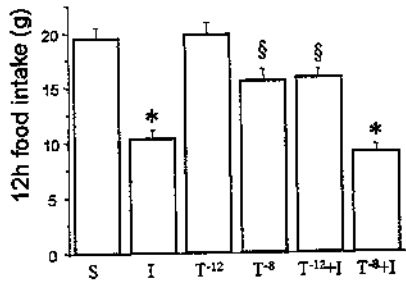
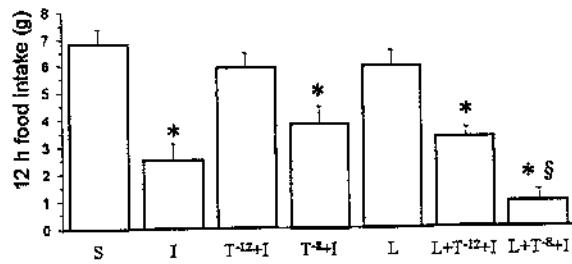


Figure 3

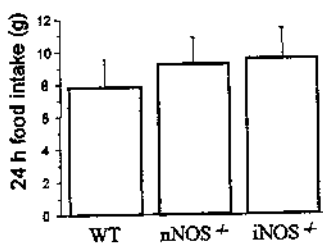
A. 12 h food intake



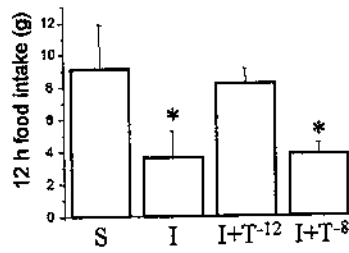
B. WT



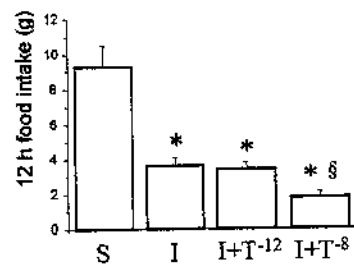
C. Food intake



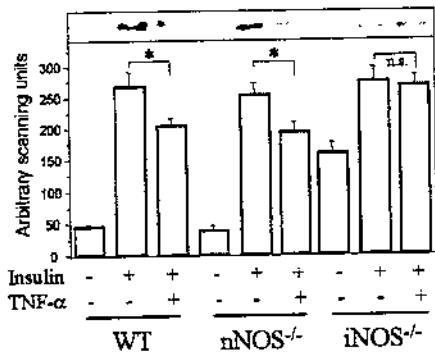
D. nNOS^{-/-}



E. iNOS^{-/-}



F. IB: pAkt



G. IB: pFOXO1

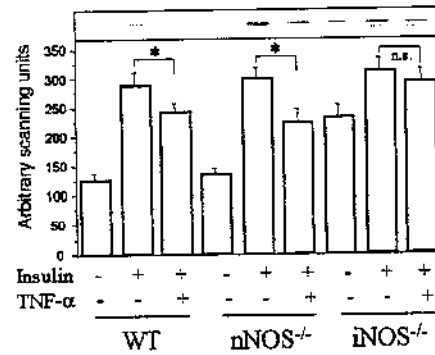
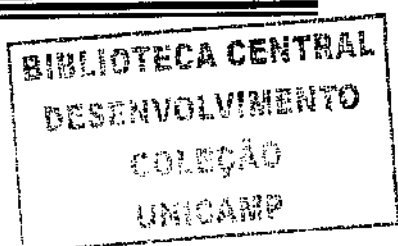


Figure 4

**4 - CONCLUSÃO
GERAL**



A citocina pró-inflamatória TNF- α induz a ativação de NOS em hipotálamo de roedores. Tal fenômeno é acompanhado pelo aumento da expressão de pelo menos duas isoformas da enzima, as isoformas nNOS e iNOS. Tanto a ativação de vias de sinalização celular pró-inflamatórias, como a indução de expressão de iNOS e nNOS pelo TNF- α em hipotálamo ocorre de acordo com um padrão dose-dependente. Entretanto, as doses ótimas para cada evento são distintas, de tal forma que a indução da via pró-inflamatória ocorre com doses mais elevadas de TNF- α enquanto a indução da expressão de nNOS e iNOS ocorre em doses mais baixas. O TNF- α também exerce um efeito modulador sobre a atividade anorexigênica da insulina neste território anatômico. Aqui também ocorre uma regulação dependente da dose de TNF- α . Assim, agindo de forma isolada, doses mais elevadas de TNF- α inibem a fome enquanto doses baixas da citocina não tem efeito detectável, porém, em associação com a insulina, doses elevadas do TNF- α não tem efeito enquanto doses baixas podem inibir a ação deste hormônio. Utilizando camundongos *knockout* para nNOS e iNOS observamos que somente a deficiência de iNOS é capaz de modificar o padrão de ação do TNF- α sobre a atividade anorexigênica da insulina. Nestes animais as doses baixas de TNF- α não modulam a ação anorexigênica da insulina enquanto doses elevadas promovem uma potencialização da ação do hormônio. Em conclusão, o TNF- α atua sobre iNOS produzindo um efeito regulador sobre a ação anorexigênica da insulina. A isoforma nNOS também pode ser regulada por TNF- α no hipotálamo mas tal regulação não interfere com a ação da insulina neste sitio anatômico.

***5 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Adamson, G. M., and Billings, R. E. (1993). Cytokine toxicity and induction of NO synthase activity in cultured mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 119, 100-107.

Barreiro, G. C., Prattali, R. R., Caliseo, C. T., Fugiwara, F. Y., Ueno, M., Prada, P. O., Velloso, L. A., Saad, M. J., and Carvalheira, J. B. (2004). Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 992-997.

Bernardini, R., Kamilaris, T.C., Calogero, A.E., Johnson, E.O., Gomez, M.T., Gold, P.W. and Chrousos, G.P. (1990). Interactions between tumor necrosis factor alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion in rat. *Endocrinology* 126, 2876-81.

Bristulf, J. and Bartfai, T. (1995). Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha stimulate the mRNA expression of interleukin 1 receptors in mouse anterior pituitary AtT-20 cells. *Neurosci Lett* 187, 53-6.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 682-685.

Calignano, A., Persico, P., Mancuso, F., and Sorrentino, L. (1993). Endogenous nitric oxide modulates morphine-induced changes in locomotion and food intake in mice. *Eur J Pharmacol* 231, 415-419.

Carvalheira, J. B., Ribeiro, E. B., Araujo, E. P., Guimaraes, R. B., Telles, M. M., Torsoni, M., Gontijo, J. A., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (2003). Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46, 1629-1640.

Carvalheira, J. B., Siloto, R. M., Ignacchitti, I., Brenelli, S. L., Carvalho, C. R., Leite, A., Velloso, L. A., Gontijo, J. A., and Saad, M. J. (2001). Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500, 119-124.

- Czech, D. A. (1998). A nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine, attenuates glucoprivic feeding and deprivation-induced drinking in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 60, 601-607.
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192-4199.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.
- Flier, J. S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350.
- Forstermann, U., and Kleinert, H. (1995). Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352, 351-364.
- Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- Gaskin, F. S., Farr, S. A., Banks, W. A., Kumar, V. B., and Morley, J. E. (2003). Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides* 24, 913-918.
- Gupta, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol* 37, 293-299.
- Hakansson, M. L., Hulting, A. L., and Meister, B. (1996). Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus--relationship with NPY neurones. *Neuroreport* 7, 3087-3092.
- Hotamisligil, G. S. (2000). Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4, S23-27.

Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 *Suppl* 3, S53-55.

Ignarro, L. J. (1990). Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16, 477-483.

Janero, D. R. (2001). Nutritional aspects of nitric oxide: human health implications and therapeutic opportunities. *Nutrition* 17, 896-903.

Jiang, H., Stewart, C. A., and Leu, R. W. (1995). Tumor-derived factor synergizes with IFN-gamma and LPS, IL-2 or TNF-alpha to promote macrophage synthesis of TNF-alpha and TNF receptors for autocrine induction of nitric oxide synthase and enhanced nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Immunobiology* 192, 321-342.

Kershaw, E. E., and Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

MacEwan, D. J. (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14, 477-492.

Matthys, P. and Billiau, A. (1997). Cytokines and Cachexia. *Nutrition* 13, 763-70

Mayer, B., John, M., and Bohme, E. (1990). Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277, 215-219.

Morley, J. E., Alshaher, M. M., Farr, S. A., Flood, J. F., and Kumar, V. B. (1999). Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides* 20, 595-600.

Morley, J. E., and Flood, J. F. (1992). Competitive antagonism of nitric oxide synthetase causes weight loss in mice. *Life Sci* 51, 1285-1289.

- Morley, J. E., and Flood, J. F. (1994). Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am J Physiol* 266, R164-168.
- Morley, J. E., Kumar, V. B., Mattammal, M., and Villareal, D. T. (1995). Measurement of nitric oxide synthase and its mRNA in genetically obese (ob/ob) mice. *Life Sci* 57, 1327-1331.
- Murata, J., Corradin, S. B., Janzer, R. C., and Juillerat-Jeanmeret, L. (1994). Tumor cells suppress cytokine-induced nitric-oxide (NO) production in cerebral endothelial cells. *Int J Cancer* 59, 699-705.
- Nicolson, A. G., Haites, N. E., McKay, N. G., Wilson, H. M., MacLeod, A. M., and Benjamin, N. (1993). Induction of nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1269-1274.
- Paxinos, G., Watson, C. R., and Emson, P. C. (1980). AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3, 129-149.
- Plata-Salaman, C.R. (2000). Central nervous system mechanisms: contributing to the caquexia- anorexia syndrome. *Nutrition* 16, 1009-12.
- Plum, L., Schubert, M., and Bruning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16, 59-65.
- Rizk, N.M., Stammsen, D., Preibisch, G. and Eckel, J. (2001). Leptin and tumor necrosis factor alpha induce the tyrosine phosphorylation of signal transducer and activation of transcription proteins in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* 142, 3027-32.
- Romero, L. I., Tatro, J. B., Field, J. A., and Reichlin, S. (1996). Roles of IL-1 and TNF-alpha in endotoxin-induced activation of nitric oxide synthase in cultured rat brain cells. *Am J Physiol* 270, R326-332.
- Saad, M. J., Carvalho, C. R., Thirone, A. C., and Velloso, L. A. (1996). Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 271, 22100-22104.

- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Schaffhauser, A. O., Stricker-Krongrad, A., Brunner, L., Cumin, F., Gerald, C., Whitebread, S., Criscione, L., and Hofbauer, K. G. (1997). Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46, 1792-1798.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Shoelson, S. E., Lee, J., and Yuan, M. (2003). Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 *Suppl* 3, S49-52.
- Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257, 494-496.
- Spiegelman, B. M., and Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.
- Squadrito, F., Calapai, G., Altavilla, D., Cucinotta, D., Zingarelli, B., Arcoraci, V., Campo, G. M., and Caputi, A. P. (1994). Central serotonergic system involvement in the anorexia induced by NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 255, 51-55.
- Torsoni, M. A., Carvalheira, J. B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M. A., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2003). Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E216-223.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

Ueta, Y., Levy, A., Chowdrey, H. S., and Lightman, S. L. (1995). Inhibition of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in the rat paraventricular nucleus by food deprivation is independent of serotonin depletion. *J Neuroendocrinol* 7, 861-865.

White, M. F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 *Suppl* 2, S2-17.

White, M. F. (1998). The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 53, 119-138.

Wisse, B.E., Schwartz, M.W. and Cummings, D.E. (2003). Melanocortin signaling and anorexia in chronic disease in rats. *Ann N Y Acad Sci* 994, 275-81.

Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S. (2005). PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115, 951-958.

Yamada, J., Sugimoto, Y., Yoshikawa, T., and Horisaka, K. (1996). Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT-induced hyperphagia in rats. *Eur J Pharmacol* 316, 23-26.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., and Shoelson, S. E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673-1677.

Zhai, Q.H., Futrell, N. and Chen, F.J. (1997). Gene expression of IL-10 in relationship to TNF alpha, IL-1 beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 152, 119-24.

6 - APÊNDICE

Materiais e Métodos

Anticorpos e Reagentes

Utilizamos anticorpos policlonais para as proteínas fos e jun, INOS, nNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA), p-AKT (Upstate Cell Signalling Solutions) e p-FOXO (Cell Signalling Technology). Reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e *immunoblotting* foram obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Proteína A-Sepharose 6MB foi obtida da Pharmacia (Uppsala, Sweden), ¹²⁵I-Protein A e membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham Corp. (Aylesbury, UK). TNF α foi obtido da Calbiochem USA.

Animais

Para o estudo foram utilizados ratos machos da cepa Wistar provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais de 8 semanas foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por unidade, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Os animais foram divididos em 6 grupos, correspondentes aos time courses para TNF α (5,15,20,30,60,120,180 minutos) recebendo água "*ad libitum*" e ração Purina (contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração). Foram seguidas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal. Foi utilizado também camundongos C57Bl/6 knockouts (KO) para a isoforma da enzima nNOS (nNOS -/-) e para a isoforma iNOS (iNOS -/-), com seus respectivos controles wild-type.

Procedimento cirúrgico e extração do hipotálamo

Os animais (250-300g ou camundongos) foram anestesiados com ketamin (100 mg/Kg, ip) e posicionados sob o aparelho esterotáxico fixando sua cabeça e boca. A cânula foi fixada em um lugar apropriado no aparelho. A coordenada é 0° no local onde sua

boca foi fixada. Após fixada a cabeça foi feita a incisão; o periósteo foi aberto expondo a sutura sagital. As coordenadas lateral, anteroposterior e dorsoventral do ventrículo lateral do hipotálamo foram obtidas do atlas Paxinos and Watson (Paxinos et al., 1980). O bregma foi usado como ponto de referência e um orifício foi perfurado no osso parietal na junção das coordenadas lateral e anteroposterior. Dois pequenos orifícios foram perfurados ao redor do orifício central, e os parafusos de aço inoxidável serão inseridos pela metade. A cânula foi posicionada no orifício central e abaixada cuidadosamente até que a coordenada dorsoventral fosse alcançada. A cânula foi fixada no crânio usando uma resina. Após a secagem da resina o animal foi retirado do aparelho e ficou 7 dias se recuperando do procedimento cirúrgico. Após estes sete dias, é realizado teste com angiotensina II ($2\mu\text{l} / 10^{-4}\text{M}$) diluída em solução salina, injetada na cânula, para verificar se esta foi corretamente inserida no hipotálamo. O efeito central da angiotensina é a sede no animal.

Infusões intracerebroventricular

Após dois dias do teste de AII, foi injetado na cânula $\text{TNF}\alpha 10^{-8}\text{ M}$ e $10^{-12}\text{ M} / 2\mu\text{l}$. Nos grupos para determinação dose-resposta via $\text{TNF}\alpha$, também foram utilizadas as doses 10^{-6} 10^{-10} 10^{-14} . Em seguida, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (15 mg/100 g de peso, i.p.), assegurando a perda dos reflexos. Após períodos pré-estabelecidos em *time-courses* (5,15,20,30,60,120,180 minutos) os animais tiveram o hipotálamo retirado, o qual foi submetido à imunoprecipitação, *immunoblotting* ou ensaio para detecção de NO.

Nos animais KO, foram seguidos três grupos: um grupo recebeu apenas insulina na cânula (1 μl), outro recebeu $\text{TNF}\alpha 10^{-8}\text{ M}$ e uma hora depois, insulina e o outro grupo recebeu $\text{TNF}\alpha 10^{-12}\text{ M}$ e após uma hora, insulina. Após esses tratamentos, foram colocados em gaiolas individuais com 40g de ração, afim de que fosse realizada a medida da ingestão alimentar por 12 horas. Após esse tempo transcorrido, os animais foram anestesiados e o hipotálamo foi removido para a determinação das proteínas da via de sinalização insulínica, a AKT e o fator de transcrição FOXO, via preparação de extrato total e western blotting.

Análise de proteínas por immunoblotting

O hipotálamo extraído foi submetido a homogeneização em tampão de extração [1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2 mmol/l PMSF; 0.2 mg/ml aprotinina], à 4°C. Os fragmentos celulares foram centrifugados (11.000 rpm, 20 minutos, 4° C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se para isso, o reagente Biureto. O sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight*, à 4°C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A sepharose 6 MB à 4°C. Após lavagem e centrifugação, as proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) e aquecidas rapidamente em água fervente. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, como descrito por Towbin (Towbin et al., 1979). A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0.02% Tween 20) à temperatura ambiente. A membrana foi então incubada *overnight* com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (3% leite em pó desnatado). Após, foi incubada com 5 µCi de [¹²⁵I] Proteína A (30 µCi/µg) em tampão de bloqueio à temperatura ambiente. A proteína A [¹²⁵I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isso, o cassete contendo a membrana e o filme foi mantido à temperatura de - 80°C, e após 12-48 horas, as bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa Scion Image (Scioncorp).

Quantificação da atividade da NOS

Após sua remoção, os hipotálamos foram colocados em tampão composto por PBS pH 7.4, contendo 1% de NP40 (Calbiochem, USA), 2mM de PMSF, 1 μ M de pepstanina, 20mM de EDTA e 3.7 mg/ml de iodocetamida (Calbiochem USA). As amostras são colocadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 20000 x g em microcentrífuga. O sobrenadante foi aspirado e a proteína estimada pelo método biureto.

Para cada amostra de NOS, 30 μ g de amostra do tecido foi adicionada à mistura de reação (50 μ l) : 33.3 mM de Pipes-NaOH pH 7.0; 0.12 mM NADPH, 0.4 mM CaCl₂, 0.33 μ g/ml de calmodulina, 0.33 mM DTT, 0.33 mM de EDTA, 1 mM de niacinamida (Calbiochem, USA), 50 μ l de ¹⁴C-L-arginina (Amershan Biosciences UK Limited). A incubação foi em períodos específicos de tempo à 37° C. A reação de NOS foi concluída adicionando 2.5 volumes de metanol gelado. As amostras foram deixadas no gelo por 20 minutos e centrifugadas a 20000 x g por 10 minutos em uma centrífuga. O líquido foi então colocado em uma placa TLC gel de sílica, seca, e então submetida à cromatografia. Para isso, o solvente usado foi hidróxido de amônio:clorofórmio:metanol:água (2:0.5:4.5:1). A cromatografia foi executada até que o solvente alcançasse pelo menos 10 cm da origem. Após a cromatografia, a radioatividade nas placas de TLC foram contadas usando um scanner radioativo. A quantidade de ¹⁴C citrulina que correspondia a cada amostra foi contada e comparada com o tempo zero.