

ERIKA ANNE DE FREITAS ROBLES ROMAN

**ATIVACÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
AMPK/ACETIL-CoA CARBOXILASE NO HIPOTÁLAMO
DE RATOS EXPOSTOS À BAIXA TEMPERATURA**

CAMPINAS

2006

ERIKA ANNE DE FREITAS ROBLES ROMAN

**ATIVACÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
AMPK/ACETIL-CoA CARBOXILASE NO HIPOTÁLAMO
DE RATOS EXPOSTOS À BAIXA TEMPERATURA**

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

Orientador: Prof. Dr. MÁRCIO ALBERTO TORSONI

Co-orientador: Prof. Dr. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

CAMPINAS

2006

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

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

R661a Roman, Erika Anne de Freitas Robles
Ativação da via de sinalização AMPK/Acetil-CoA carboxilase no hipotálamo de ratos expostos à baixa temperatura / Erika Anne de Freitas Robles Roman. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores : Márcio Alberto Torsoni, Lício Augusto Velloso
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Resistência à insulina. 2. Frio. 3. Hipotálamo. I.
Torsoni, Márcio Alberto. II. Velloso, Lício Augusto. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Título em inglês : Activation of AMPK/Acetyl-CoA carboxylase in the hypothalamus of cold exposed rats

Keywords: • Insulin resistance

- Cold
- Hypothalamus

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof Dr Márcio Alberto Torsoni
Prof Dr Mário José Abdalla Saad
Prof Dr Márcio Pereira da Silva**

Data da defesa: 31-08-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Marcio Pereira da Silva _____

2. Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad _____

3. Prof(a). Dr(a). Márcio Alberto Torsoni _____

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

Data: 31/08/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduardo e Terezinha, que, pelo amor incondicional dispensado a mim, sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Custa-me acreditar que este momento chegou, o de concluir um trabalho desenvolvido por mim com tanto carinho, suor e lágrimas, aliás, muitas lágrimas. Chego a desacreditar que isto está acontecendo...

Próximo de concluir meu mestrado, reflito sobre a época em que era apenas uma adolescente e tencionava prestar vestibular na Unicamp. Acreditava que o exame de seleção desta universidade era uma barreira quase intransponível, já que a vida inteira havia estudado em escolas públicas. Mesmo assim me dei a liberdade de acreditar que seria aluna desta Instituição. Consegui. Entrei no curso de Ciências Biológicas, no ano de 1999, e não há um só dia em minha vida que me esqueça de como Deus foi crucial para que eu obtivesse esta vitória. Deus ali, sempre junto a mim, passo a passo, amparando, guiando e me incentivando em todas as buscas. Rendo graças a Deus, pois se hoje concluo minha dissertação de mestrado foi porque primeiro recebi Dele tranquilidade e perseverança. Agradeço-O não apenas pela vitória, mas sobretudo pela trajetória, pois nela conheci pessoas especiais que contribuíram direta ou indiretamente para a execução do meu trabalho e que certamente ficarão entranhadas em mim.

À minha mamã dedico todo o meu amor. Acreditou no meu sonho e, mais do que isso, sonhou junto comigo. A cada dia incentivou-me com palavras de confiança e de carinho. Sinceramente, não conheço outra pessoa que tenha a sua garra e sensatez. Essa vitória não teria sentido se não houvesse você em minha vida.

Ao meu grande pai, matuto e amoroso, que me ensinou o valor da vida e do quanto vale a pena batalhar pelos ideais. Além disso, rotineiramente, procura dar-me exemplos de sinceridade e de honestidade. Pai, talvez o senhor não tenha a dimensão da importância que o título de mestrado significa para mim, por ser uma pessoa tão simples, mas saiba que eu não chegaria até aqui se não fosse pelo seu amparo.

Aos meus irmãos (Eliezer, Eduardo, Edivânia e Elifaz) que, sempre unidos, fizeram da nossa família um grupo especial, com o qual sempre pude contar.

Aos meus sobrinhos (Damaris, Raul, Rene, Lúcia, Eliezer, Eduardo, Igor e Eloísa) que sempre me encheram de muito carinho e amor. Vocês são a razão do meu viver.

Ao meu querido orientador, Márcio Alberto Torsoni, mais do que um grande professor, um verdadeiro irmão. Das suas muitas virtudes, a que mais exercitou comigo, e por isso agradeço, foi a da paciência. Com ele aprendi que a Ciência deve ser tratada com seriedade e meticulosidade e que para se fazer Ciência são necessários muita dedicação e estudo. Márcio, você foi imprescindível para minha formação acadêmica, pois me acompanhou desde o meu primeiro ano de graduação (1999). Além da contribuição intelectual, agradeço-o, sobretudo, pela contribuição pessoal, pois sempre fui insegura, o “poço do estresse oxidativo”, e você acreditou em mim em momentos nos quais nem eu mesma acreditava.

Ao caro co-orientador Lício Augusto Velloso, que me acolheu em seu laboratório e que, pacientemente, durante alguns meses, recebeu a mim, a Jú e a Tata – recém-ingressadas no curso de mestrado - em sua sala para orientar os nossos estudos. Lício, a cada dia que saía de sua sala, após horas de estudos, recebia uma injeção de ânimo e pensava em estudar ainda mais, pois naqueles momentos de estudo tomava ciência de que o que eu sabia era apenas a pontinha do “iceberg”. O seu exemplo de seriedade, inteligência e organização me acompanhará em qualquer área que venha a seguir.

Ao caro professor Mário Saad que, mesmo com toda a sua importância, dá-nos cotidianamente lições de simplicidade e de humildade.

À querida amiga Mari, que me iniciou nos caminhos da Ciência. Mari, nunca me esquecerei de toda a dedicação e de todo o carinho que me dispensou enquanto eu dava meus primeiros passos como pesquisadora. Para mim, foi um privilégio ter uma pessoa como você - com um excelente senso de humor - a me ensinar. Teve a paciência de instruir-me não só acerca da execução dos protocolos, como também dos procedimentos triviais, como o nome das vidrarias e os cuidados que devemos tomar ao utilizarmos material biológico. Naquele momento, esses procedimentos pareciam muito difíceis. Ah! Agradeço-a também Mari, pela oportunidade que me deu, quando me entrevistou lá na Bioquímica - no meu primeiro ano de graduação - e confiou que eu levaria a sério a pesquisa.

À querida amiga Grá, que sempre ouviu as minhas angústias e desilusões em relação à docência e à pesquisa e que, paciente e sabiamente, aconselhou-me. Grá, obrigada por todo o apoio que me deu. Se hoje resgatei o amor pela vida acadêmica, saiba que você contribuiu muito para isso.

À querida Tata, cantora oficial do laboratório. Agradeço a você pelo carinho e pela amizade sincera. Bem que poderíamos fazer uma dupla dinâmica, não? Mas só nos experimentos e não na vida artística, pois sou desafinada (risos).

Agradeço ainda ao senhor Lú, senhor Jósimo, senhor Zé, Luís e Gerê, que nunca se negaram a me auxiliar. Embora não tenha palavras para agradecê-los por tanta presteza, gostaria que soubessem que estou ciente de que não chegaria aqui se não fosse pela contribuição de todos vocês.

Ao caro Márcio do “container”, isso mesmo: o dono de todos os ratinhos! Márcio, Márcio....como deixar de fazer um agradecimento especial a você, um funcionário sem igual? Pronto a me auxiliar e, mais importante do que isso, a puxar a minha orelha quando necessário. Obrigada por tudo!!! Por enquanto!

Agradeço ainda a TODOS os alunos que fizeram do laboratório um ambiente agradável para se trabalhar. Em especial, gostaria de mencionar alguns colegas que estiveram mais próximos a mim e que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho, são eles: professor José Barreto, Márcio Pereira, o Eli, a Eli, Fer (Rojas), Fer (Maria), Christine, Marciane, Alê, Marcelo, Marcel, Fernando, Vivian, Paty Karoll, Pati Prada, Brahma, Mirian, Raquel, Cafu, Rodrigo, Denis, Verinha, Esméria, Helena (grande amiga). A todos a minha eterna gratidão!

Por último, gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em especial à Faculdade de Ciências Médicas (FCM) por essa tão grande oportunidade.

EPÍGRAFE

“Esforça-te, e tem bom ânimo; (...) porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares”

(Josué, 1:9)

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVO	17
2- CAPÍTULO	26
ARTIGO 1- “Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals”. J Physiol 2005;568:993-1001.....	27
3- CONCLUSÃO GERAL	38
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
5- APÊNDICE	51
Materiais e Métodos	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Antero-posterior
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AgRP	Proteína relacionada ao “agouti”
Akt	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
α – MSH	Hormônio estimulador α -melanocítico
ARC	Núcleo arqueado
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
CART	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CBS	Cistationina- β -sintase
Ci	Citrato
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPAT	Glicerol fosfato acil transferase
HLA	Área hipotalâmica lateral
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-CoA redutase
I	Insulina
IB	“Imunoblot”

ICV	Intracerebroventricular
IMC	Índice de massa corporal
IP	Imunoprecipitado
IP	Intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IRS - 1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS - 2	Substrato 2 do receptor de insulina
LHA	Área hipotalâmica lateral
LKB-1	Quinase mutada do gene “Peutz-Jeghers syndrome” (PJS)
LY – 294002	Inibidor de PI3 - quinase
MCH	Hormônio concentrador de melanina
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfona
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
RIA	Radioimunoensaio
RNAm	RNA mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
RTK	Receptores de tirosino quinase
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	Homólogos da Src 2
SNC	Sistema nervoso central

Thr172	Treonina 172
TSH	Hormônio tireoestimulante
Tris	Tri (hidroximetil) - aminometano
UCP	Proteína desacopladora
VMH	Hipotálamo ventromedial

RESUMO



A exposição de animais homeotérmicos ao frio leva a uma poderosa ativação da sinalização anorexigênica, acompanhada por resistência molecular e funcional à inibição da alimentação induzida pela insulina. Evidências recentes sugerem que a AMPK participa do controle da saciedade e da adiposidade, dependente de nutriente. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da exposição ao frio sobre a ativação molecular da sinalização da AMPK em hipotálamo de ratos. *Immunoblotting* demonstrou que a exposição ao frio por si é suficiente para induzir, em um modelo tempo dependente, a ativação molecular da serina/treonina quinase, proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a inativação da acetil-CoA carboxilase (ACC). Estes fenômenos moleculares foram acompanhados pela resistência à inativação da AMPK e pela ativação da ACC, dependentes de nutrientes. Além disso, a exposição ao frio levou a uma inibição parcial da resposta anorexigênica induzida pela alimentação, a qual foi acompanhada pela resistência à supressão da alimentação induzida pela insulina. Finalmente, a exposição ao frio prejudicou significativamente a inibição da AMPK, induzida pela insulina, através de um mecanismo dependente do “cross-talk” molecular entre fosfatidilinositol-3(PI₃)-quinase/Akt e AMPK. Como conclusão, a hiperfagia durante a exposição ao frio resulta, pelo menos em parte, da resistência hipotalâmica à sinalização anorexigênica dependente de nutrientes e insulina.

ABSTRACT



The exposure of homeothermic animals to a cold environment leads to a powerful activation of orexigenic signalling which is accompanied by molecular and functional resistance to insulin-induced inhibition of feeding. Recent evidence suggests that AMPK participates in nutrient-dependent control of satiety and adiposity. The objective of the present study was to evaluate the effect of cold exposure upon the molecular activation of AMPK signalling in the hypothalamus of rats. Immunoblotting demonstrated that cold exposure *per se* is sufficient for inducing, on a time-dependent basis, the molecular activation of the serine/threonine kinase AMP-activated protein kinase (AMPK) and inactivation of the acetyl-CoA carboxylase (ACC). These molecular phenomena were accompanied by resistance to nutrient-induced inactivation of AMPK and activation of ACC. Moreover, cold-exposure led to a partial inhibition of a feeding-induced anorexigenic response, which was paralleled by resistance to insulin-induced suppression of feeding. Finally, cold exposure significantly impaired insulin-induced inhibition of AMPK through a mechanism dependent on the molecular cross-talk between phosphatidylinositol-3(PI₃)-kinase/Akt and AMPK. In conclusion, increased feeding during cold exposure results, at least in part, from resistance to insulin- and nutrient-dependent anorexigenic signalling in the hypothalamus.

1- INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVO

O excesso de peso e a obesidade resultam da interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. O alto consumo calórico, a diminuição no gasto energético ou a combinação de ambos leva a um balanço energético positivo e um aumento acentuado no peso (Stein e Colditz, 2004). Do ponto de vista clínico, a obesidade é definida como um estado de elevado peso corporal, mais especificamente de tecido adiposo, de magnitude suficiente para produzir conseqüências adversas à saúde (Spiegelman e Flier, 2001).

A obesidade sempre esteve presente na sociedade moderna, contudo, nas últimas décadas, em razão de mudanças ambientais e comportamentais, a incidência desta enfermidade nas populações tem aumentado de maneira bastante significativa. Em muitas culturas, a obesidade era considerada um símbolo de riqueza e prestígio, particularmente naquelas culturas em que havia pouca disponibilidade de nutrientes. É muito provável que a capacidade de estocar gordura em tempos de escassez de nutrientes tenha sido uma característica positiva, selecionada ao longo dos milhares de anos da evolução humana (Neel, 1999). Atualmente, a dieta rica em calorias e o sedentarismo associados à característica genética são fatores capazes de promover o aumento das reservas energéticas do corpo, levando à obesidade.

Pesquisas recentes mostram que a prevalência da obesidade está aumentando rapidamente no mundo e é o maior fator de risco para uma série de enfermidades, incluindo diabetes, hipertensão e doenças do coração (Stein e Colditz, 2004). Conforme dados obtidos em recentes levantamentos epidemiológicos, a prevalência dessas doenças em diferentes regiões do planeta é bastante elevada. Estima-se que perto de 1 bilhão de adultos em todo o mundo apresentem obesidade ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) ou sobrepeso (IMC entre 25 e 30 Kg/m^2), o que equivale a aproximadamente 28% da população mundial (Kopelman, 2000). Projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam para prevalências maiores que 50% nos Estados Unidos e maiores que 25% no Brasil no ano de 2025 (Kopelman, 2000). Somente nos Estados Unidos, estima-se que ocorram cerca de 300.000 mortes anuais e que US\$ 117 bilhões de dólares sejam gastos, diretos ou indiretamente, com obesidade ou doenças associadas (Stein e Colditz, 2004).

Adicionalmente, a obesidade é capaz de aumentar o risco de doenças do coração e estima-se que entre 20 % e 30 % da mortalidade por doenças cardíacas pode ser atribuída ao excesso de peso (Seidell et al., 1996). Em um estudo realizado por Rexrode et al. (1993), foi mostrado que o risco de acidente vascular cerebral isquêmico aumenta de acordo com o índice de massa corpórea (IMC) e que mulheres obesas apresentam este risco aumentado em duas vezes, se comparado com mulheres magras.

A *International Agency for Research on Cancer* estimou que o excesso de peso e a obesidade são responsáveis por 9% dos cânceres de mama - pós-menopausa - 11% dos cânceres de cólon, 25% dos cânceres renais, 37% dos cânceres de esôfago e 39% dos cânceres endometriais (International Agency For Research On Cancer, World Health Organization, 2002).

Outra enfermidade importante relacionada à obesidade é o diabetes *mellitus* tipo II. Em seus estudos Chan et al. (1994) e Colditz et al. (1995) verificaram que indivíduos obesos apresentam um risco dez vezes maior de desenvolver este tipo de diabetes se comparados a indivíduos não obesos. Infelizmente, os circuitos que suprimem o apetite e aumentam o gasto energético em resposta a fatores ambientais que promovem a obesidade são insuficientes para prevenir a obesidade e suas complicações em uma grande porcentagem da população (Flier, 2004).

Já no início do século XX, acreditava-se que o hipotálamo desempenhava um importante papel no comportamento alimentar. Experimentos feitos no início dos anos 40 levaram ao desenvolvimento do modelo “*Dual Center Model*” para regulação da alimentação. Nesse modelo, a área lateral do hipotálamo (HLA) se mostrou servir como centro da alimentação e parte do hipotálamo ventromedial (VMH) como o centro da saciedade (Hetherington e Ranson, 1940). Confirmando os resultados anteriores Stellar publicou, em 1954, estudos que identificaram que o núcleo hipotalâmico ventromedial (VMN) atuava como o “centro da saciedade”, enquanto que a área hipotalâmica lateral (LHA) como o “centro da fome”.

O hipotálamo e o complexo vagal dorsal parecem ser as principais regiões dentro do sistema nervoso central que regulam diretamente o apetite. O núcleo arqueado (ARC) e o paraventricular (PVN) do hipotálamo mostraram-se integrantes na regulação do

apetite (Spiegelman e Flier, 2001). O núcleo arqueado contém pelo menos dois grupos distintos de neurônios que controlam o balanço energético: um deles é formado por neurônios que expressam neuropeptídeos orexigênicos como a proteína relacionada ao agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY) e o outro grupo é formado por neurônios que expressam neuropeptídeos anorexigênicos como o pro-opiomelanocortina (POMC) e peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Schwartz et al., 2000).

Diferentes estudos concluíram que neurônios do hipotálamo são capazes de responder a diferentes sinais metabólicos e neuroendócrinos, coordenando as respostas do corpo a mudanças na ingestão calórica e gasto energético (Spiegelman e Flier, 2001). A leptina, um hormônio derivado dos adipócitos, age sobre neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, diminuindo a liberação de neuropeptídeos orexigênicos, resultando na diminuição da ingestão alimentar. Já a grelina é um hormônio, sintetizado no estômago, que estimula a ingestão alimentar por agir, pelo menos em parte, nos mesmos circuitos neuronais envolvidos na resposta a neuropeptídeos anorexigênicos (Spiegelman e Flier, 2001).

Schwartz et al. (1992) mostraram que a injeção de insulina no 3º ventrículo de roedores leva à diminuição na ingestão alimentar e no peso corpóreo. Isto ocorre porque tanto a leptina quanto a insulina atuam como sinais de adiposidade que estimulam os neurônios POMC a secretarem neuropeptídeos anorexigênicos, como o α -MSH e o CART, que reduzem a ingestão alimentar, aumentam o consumo energético (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998; Volkoff e Peter, 2000; Li et al., 2002; Niswender e Schwartz, 2003) e estimulam UCP1, 2 e 3 em tecidos adiposo marrom, branco e músculo, respectivamente (Wang et al., 2000; Kong et al., 2003).

Por outro lado, estudos mostram que injeções de insulina e leptina reduzem a expressão gênica de neuropeptídeo Y (NPY) e da proteína relacionada ao agouti (AgRP), levando à diminuição na concentração celular desses neuropeptídeos e, conseqüentemente, à diminuição na ingestão alimentar estimulada por eles (Abe et al., 1991; Wang e Leibowitz, 1997; Ebihara et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Ziotopoulou et al., 2000; Qu et al., 2001; Kalra e Kalra, 2003). Tanto NPY, quanto AgRP são potentes orexígenos co-expressos em neurônios do ARC (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998;

Baskin et al., 1999) e são altamente responsivos a estados de deficiência energética e alta demanda metabólica (Inui, 2000; Woods e Seeley, 2000; Kalra e Kalra, 2003; Leibowitz e Hoebel, 2004).

A insulina, hormônio pancreático que atravessa a barreira hematoencefálica (Baura et al., 1993) e age no hipotálamo, reduzindo a ingestão alimentar (Woods et al., 1979), foi o primeiro sinal hormonal envolvido no controle do peso corpóreo por atuar diretamente no sistema nervoso central (SNC). Receptores de leptina e insulina são expressos por neurônios do cérebro que estão envolvidos na ingestão alimentar (Woods et al., 1979; Campfield et al., 1995; Weigle et al., 1995). Torsoni et al. (2003) demonstraram que os receptores de insulina, além de serem encontrados no núcleo arqueado são também expressos no núcleo paraventricular (PVN).

O receptor de insulina (IR) é um membro da família dos receptores de tirosina quinase (RTK) que inclui uma variedade de receptores de fatores de crescimento (Ebina, 1985; Ullrich et al., 1985; Schlessinger, 1993; Van Der Geer, 1994; Weiss, 1997). O IR consiste de duas subunidades α extracelular e duas subunidades β transmembrana unidas por pontes dissulfeto que formam um heterodímero $\alpha\beta$ (Czech, 1985). As subunidades α são inteiramente extracelulares e apresentam um domínio cisteína envolvido na ligação da insulina (Lee e Pilch, 1994). As subunidades β apresentam atividade tirosina quinase que, sob o estímulo da insulina, ativam proteínas envolvidas na sinalização celular, através da fosforilação destas em resíduos de tirosina (Cheatham e Kahn, 1995). Estas proteínas incluem os substratos do receptor de insulina (IRS)-1/2, os quais estão presentes em neurônios e tecidos periféricos (Baskin et al., 1994).

Proteínas IRS tirosina fosforiladas se ligam a domínios SH2 de proteínas sinalizadoras, como a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), a qual ativa a subunidade catalítica (p110) dessa mesma enzima (Saltiel e Pessin, 2002). Diversos estudos mostraram que a PI3K é um importante mediador na regulação do metabolismo, incluindo translocação de GLUT4, através da fosforilação e ativação da proteína quinase B (AKT) (Cheatham et al., 1994; Kotani et al., 1995; Quon et al., 1995; Martin et al., 1996; Sakaue et al., 1997) e ativação da enzima glicogênio sintase (Cross et al., 1995).

Adicionalmente, tem sido atribuído à insulina o papel de moduladora do metabolismo celular em razão do controle negativo que este hormônio exerce sobre a AMPK (proteína ativada por AMP). De acordo Kovacic (2003), a insulina atua sobre a AMPK através da via (PI₃)-K/Akt em diferentes tecidos.

A AMPK, em mamíferos, pode ser constituída por diferentes subunidades, α 1, α 2, β 1, β 2 e γ 1-3, cada uma delas é codificada por um gene diferente. A subunidade α 1 é mais comum, na medida em que ela está presente em diversos tecidos e é encontrada principalmente no citosol. A subunidade α 2 está restrita ao coração, músculo e fígado e se encontra tanto no citosol quanto no núcleo celular (Chen et al., 1999; Da Silva Xavier et al., 2000; Woods et al., 2000). No músculo esquelético, a ativação da AMPK aumenta a captação da glicose e a oxidação de ácidos graxos no interior da mitocôndria (Kahn et al., 2005). No fígado, a ativação da AMPK suprime a produção de glicose (Kahn et al., 2005). A AMPK é também expressa em neurônios do sistema nervoso central (Turnley et al., 1999; Culmsee et al., 2001) e a modulação de sua atividade no hipotálamo é suficiente para alterar a ingestão alimentar e o peso corpóreo (Minokoshi et al., 2004).

A AMPK foi primeiramente descrita como uma enzima capaz de fosforilar e inativar hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA) e acetil-CoA-carboxilase (ACC), enzimas chaves na síntese de colesterol e ácidos graxos, respectivamente (Beg et al., 1973; Carlson e Kim, 1973). Esta enzima quinase (AMPK) é uma enzima heterotrimérica que consiste em uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (Stapleton et al., 1997). A subunidade α contém um domínio catalítico na região N-terminal e um domínio regulatório na região C-terminal, que permite a ligação entre as subunidades β e γ , além disso, esta subunidade contém uma região auto-inibitória (Crute et al., 1998).

A subunidade β contém um domínio para ligação de glicogênio (GBD) que é comumente encontrado em enzimas que metabolizam ramificações (α 1 \rightarrow 6 em α 1 \rightarrow 4) de amido e glicogênio (Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2003). Esta subunidade contém também um domínio C-terminal que permite a ligação das subunidades α e γ , formando assim um complexo (Hudson et al., 2003).

A subunidade γ da AMPK contém quatro seqüências repetidas, formadas por, aproximadamente, sessenta resíduos de aminoácidos e que foram primeiramente reconhecidas por Bateman (1997) e originalmente chamadas de domínios CBS (Cistationina- β -sintase). Cada um destes domínios é capaz de se ligar ao AMP ou ATP de uma maneira mutuamente excludente (Scott et al., 2004).

Na célula, a AMPK atua como um sensor energético intracelular (Hardie et al., 2003) e sua atividade é regulada pela razão AMP/ATP (Hardie et al., 1999). O aumento na razão AMP/ATP ativa a AMPK em três vias: (1) a fosforilação da AMPK em Thr 172, pela enzima quinase AMPKK (conhecida como LKB-1), (2) modificação alostérica, e (3) inibição da proteína fosfatase-2C. Este complexo mecanismo regulatório permite que a atividade da AMPK seja sensível a pequenas mudanças nas concentrações intracelulares de AMP. Dentre as condições que alteram a razão AMP/ATP incluem-se exercícios físicos, fome, diabetes *mellitus*, hipóxia, isquemia, reperfusão, estresse oxidativo e choque térmico (Vavvas et al., 1997; Hardie, 1999; Choi et al., 2001; Marsin et al., 2002; Christopher et al., 2003).

Quando ativada a AMPK inibe as vias de consumo de ATP (síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol) e ativa as vias que geram ATP (glicólise e oxidação de ácidos graxos), mantendo assim o balanço energético intracelular. Em roedores, a AMPK hipotalâmica é inibida por altas concentrações de glicose, leptina e insulina, ou seja, moléculas que diminuem a ingestão alimentar. Já a grelina, um hormônio produzido pelo estômago e que estimula a ingestão alimentar, ativa a AMPK (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004). Portanto, a AMPK parece servir como um elo entre os sinalizadores nutricionais e hormonais os quais provêm da alimentação e das reservas energéticas, o que a torna um atrativo alvo terapêutico para o tratamento da obesidade (Minokoshi et al., 2004).

Há muito que a exposição de animais homeotérmicos ao frio tem sido empregada como um modelo para os estudos acerca da termogênese, estresse e regulação de diversos parâmetros metabólicos (Himms-Hagen, 1989; Vallerand e Jacobs, 1992). Quando animais experimentais são mantidos a baixa temperatura ou, então, são tratados com halotano (Hoo-Paris et al., 1988; Bing et al., 1998), uma rápida queda do nível

circulante de leptina é observada, o que é acompanhado por aumento da ingestão alimentar. Entretanto, animais expostos à baixa temperatura, diferente do que ocorre em situações fisiológicas normais (temperatura externa mantida ao redor de 22°C), apresentam aumento de apetite sem que ocorram alterações nos níveis de NPY hipotalâmicos (Bing et al., 1998).

A exposição ao frio gera uma situação de catabolismo, que encontra certa semelhança metabólica com os quadros de diabetes *mellitus* insulino-dependente, jejum prolongado e lactação. Nestas situações há perda de peso, aumento da ingestão alimentar e reduzidos níveis de insulina e leptina circulantes. Contudo, animais em lactação (Malabu et al., 1994) e animais em jejum prolongado (Goldstein e Curnow, 1978) apresentam níveis normais de glicose circulante, enquanto animais diabéticos apresentam níveis elevados em função da produção endógena (Best et al., 1982; DeFronzo et al., 1982; Bogardus et al., 1984; Firth et al., 1986; Campbell et al., 1988; DeFronzo et al., 1992).

Com relação à temperatura corpórea, animais diabéticos, em lactação e em jejum prolongado são hipotérmicos, ou seja, em temperatura ambiente (22° C) mantêm temperatura corporal mais baixa que controles, indicando menor termogênese (Bing et al., 1998). Já animais expostos ao frio, embora tenham a temperatura corpórea reduzida, apresentam alta termogênese, o que é evidenciado por altos níveis de RNAm de UCP-1 em tecido adiposo marrom (MacCarthy et al., 1993; Trayhurn et al. 1987). Desta forma se torna evidente que, no hipotálamo, a informação que vem de sensores periféricos indicando que a temperatura externa é baixa e que, portanto, deve-se aumentar a termogênese, deve estar desacoplada do estímulo anorexigênico que, em geral ocorre em paralelo ao aumento da termogênese.

Recentemente Gasparetti et al. (2003), Pereira-Da-Silva et al. (2003) e Torsoni et al. (2003), mostraram que animais expostos ao frio apresentam baixas concentrações de leptina e insulina circulante, além de resistência molecular e funcional à ação da insulina no hipotálamo. Como demonstrado em estudos já mencionados anteriormente, a AMPK é uma enzima diretamente relacionada com a ingestão alimentar e aquisição de peso corpóreo e que é modulada negativamente pela insulina, via PI3K/AKT. Portanto, a modulação desta proteína (AMPK) no hipotálamo pode estar relacionada aos eventos moleculares decorrentes da exposição dos animais ao frio.

Dentro desse contexto, foi de nosso interesse avaliar o efeito da exposição ao frio sobre a ativação da AMPK e a relação desta enzima com o sinal da insulina no hipotálamo.

2- CAPÍTULO



THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY

Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals

Erika A Roman, Maristela Cesquini, Graziela R Stoppa, José B Carvalheira, Márcio A Torsoni and Lício A Velloso

J. Physiol. 2005;568;993-1001; originally published online Sep 1, 2005;

DOI: 10.1113/jphysiol.2005.095687

This information is current as of January 23, 2006

This is the final published version of this article; it is available at:
<http://jp.physoc.org/cgi/content/full/568/3/993>

This version of the article may not be posted on a public website for 12 months after publication unless article is open access.

The Journal of Physiology Online is the official journal of The Physiological Society. It has been published continuously since 1878. To subscribe to *The Journal of Physiology Online* go to: <http://jp.physoc.org/subscriptions/>. *The Journal of Physiology Online* articles are free 12 months after publication. No part of this article may be reproduced without the permission of Blackwell Publishing: JournalsRights@oxon.blackwellpublishing.com

Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals

Erika A. Roman¹, Maristela Cesquini¹, Graziela R. Stoppa¹, José B. Carvalheira¹, Márcio A. Torsoni^{1,2} and Lício A. Velloso¹

¹Department of Internal Medicine, State University of Campinas and ²Braz Cubas University, Mogi das Cruzes, Brazil

The exposure of homeothermic animals to a cold environment leads to a powerful activation of orexigenic signalling which is accompanied by molecular and functional resistance to insulin-induced inhibition of feeding. Recent evidence suggests that AMPK participates in nutrient-dependent control of satiety and adiposity. The objective of the present study was to evaluate the effect of cold exposure upon the molecular activation of AMPK signalling in the hypothalamus of rats. Immunoblotting demonstrated that cold exposure *per se* is sufficient for inducing, on a time-dependent basis, the molecular activation of the serine/threonine kinase AMP-activated protein kinase (AMPK) and inactivation of the acetyl-CoA carboxylase (ACC). These molecular phenomena were accompanied by resistance to nutrient-induced inactivation of AMPK and activation of ACC. Moreover, cold-exposure led to a partial inhibition of a feeding-induced anorexigenic response, which was paralleled by resistance to insulin-induced suppression of feeding. Finally, cold exposure significantly impaired insulin-induced inhibition of AMPK through a mechanism dependent on the molecular cross-talk between phosphatidylinositol-3 (PI₃)-kinase/Akt and AMPK. In conclusion, increased feeding during cold exposure results, at least in part, from resistance to insulin- and nutrient-dependent anorexigenic signalling in the hypothalamus.

(Resubmitted 1 August 2005; accepted after revision 30 August 2005; first published online 1 September 2005)

Corresponding author L. A. Velloso: Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences (FCM), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, 13083-970, Brazil. Email: lavelloso@fcm.unicamp.br

During the last decade obesity has reached epidemic proportions in populations of several regions of the world (Friedman, 2000; Kopelman, 2000). The loss of a coordinated control between food intake and energy wastage is thought to play a pivotal role in the progressive gain of body weight and adiposity observed in overweight people (Flier, 2004). So far, leptin and insulin are known to be the most important adipostatic factors (Flier, 2004), controlling neurones of the arcuate nucleus that expresses orexigenic (neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein homologue (AGRP)) and anorexigenic (α -melanocyte-stimulating hormone (MSH) and cocaine and amphetamine related transcript (CART)) neurotransmitters (Schwartz *et al.* 2000). The role played by the nutrients, *per se*, in the control of adiposity has been a question long debated (Jequier, 2002). Most data suggest that nutrients may have a role only as satiety signals (Blundell & MacDiarmid, 1997; Roberts,

2000). However, in a recent study, Minokoshi *et al.* (2004) showed that the serine/threonine kinase AMP-activated protein kinase (AMPK) participates as a molecular link between hormone and nutrient signals to hypothalamic neurones that control feeding and adiposity.

Homeothermic animals adapted to the cold environment provide a reproducible physiological model for studying several aspects of energy accumulation and expenditure (Vallerand *et al.* 1987; Gasparetti *et al.* 2003). During cold exposure, homeothermic animals become hyperphagic and resistant to the anorexigenic signals generated by insulin (Gasparetti *et al.* 2003; Pereira-Da-Silva *et al.* 2003; Torsoni *et al.* 2003). Considering that hyperphagia may provide the hypothalamus with a surplus of nutrient anorexigenic signals, we suspect that, in order to maintain continuous feeding, a mechanism of resistance to this signal may evolve in parallel with the already known resistance to hormonal inputs. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the participation of AMPK in the control of feeding behaviour of rats exposed to a cold environment.

M. A. Torsoni and L. A. Velloso contributed equally as supervisors for this study.

Methods

Antibodies, chemicals and buffers

Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Hepes, phenylmethylsulphonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, bovine serum albumin (fraction V), citrate and LY-294002 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, $0.2\ \mu\text{m}$) was from Amersham (Aylesbury, UK). Sodium thiopental and human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Polyclonal anti-phosphotyrosine antibodies were raised in rabbits and affinity purified on phosphotyramine columns. Anti-phospho-[Ser 473] Akt (rabbit polyclonal, sc-7985-R) and anti-insulin receptor (IR) β (rabbit polyclonal, sc-711) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-phospho-[Ser 79] ACC (rabbit polyclonal, #07-184) was from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA, USA). Anti-ACC (goat polyclonal, sc-26816) was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anti-phospho-[Thr 172] AMPK α (rabbit polyclonal, #2531) and anti-AMPK α (rabbit polyclonal, #2532) were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Insulin was determined by radioimmunoassay (RIA).

Experimental animals, intracerebroventricular (i.c.v.) cannulation and cold exposure protocols

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (8 weeks old/200–300 g) obtained from the University of Campinas Animal Breeding Center were used in the experiments. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23 revised 1996). The animals were maintained on 12:12 artificial light–dark cycles and housed in individual cages. After the acclimatizing period (3 days), the animals were stereotaxically instrumented under sodium thiopental anaesthesia (diluted in saline, $15\text{--}40\ \text{mg (kg body weight)}^{-1}$, intraperitoneal (I.P.)) with chronic unilateral 26-gauge stainless steel indwelling guide cannulas, aseptically placed into the lateral ventricle (0.2 mm posterior, 1.5 mm lateral and 4.2 mm ventral to bregma) as previously described (Michelotto *et al.* 2002). Post-operative analgesia was provided by the use of $0.05\ \text{mg kg}^{-1}$ buprenorphine I. Cannula placement was confirmed by a positive drinking response after administration of angiotensin II ($40\ \text{ng (2}\ \mu\text{l)}^{-1}$). After

a one-week recovery period, all rats were placed in individual cages and exposed either to $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (control) or to $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ($T_4^\circ\text{C}$) for three days, or for shorter periods of time, according to the description in the Results section. The animals were allowed free access to standard rodent chow and water *ad libitum*. For tissue extraction (at day 2 of the experimental protocol), rats were anaesthetized by I.P. injection of sodium thiopental ($15\text{--}40\ \text{mg (kg body weight)}^{-1}$), and the experiments were performed after the loss of corneal and pedal reflexes. Following experimental procedures, the rats were killed under anaesthesia (thiopental $> 200\ \text{mg kg}^{-1}$) following the recommendations of the NIH publication no. 85-23.

Metabolic, hormone and biochemical measurements

Measurements of food intake, rectal temperature and body weight (during the light cycle) were obtained at time 0 and 2 h from the beginning of the experimental period, and daily, during the three experimental days in control and cold-exposed rats. Rectal temperature was measured with a Thermistor high precision digital thermometer (Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, RI, USA) inserted 1.5 cm from the anus. Blood samples were always obtained from rats fasted for 2 h on the morning of the second experimental day. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method in samples collected from the tail (Trinder, 1969). Insulin was detected by RIA, utilizing a guinea pig antirat insulin antibody and rat insulin as standard (Scott *et al.* 1981). Corticosterone and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured by RIA, according to the manufacturer's specifications.

Protocol for food ingestion determination

One week after cannula installation, the rats were randomly sorted into cold exposure or thermoneutrality protocols, in metabolic, individual cages. At 6 p.m. on the second experimental day (after 6 h of food deprivation), insulin ($2\ \mu\text{l}, 10^{-6}\ \text{M}$), citrate ($2\ \mu\text{l}$ containing 200 pmol) or saline ($2\ \mu\text{l}$) were injected into the cannula. Food ingestion was determined over the next 12 h.

Tissue extraction, immunoblotting and immunoprecipitation

Anaesthetized rats were acutely treated, or not, with insulin ($2\ \mu\text{l}, 10^{-6}\ \text{M}$) or saline ($2\ \mu\text{l}$) through the i.c.v. cannula. After different intervals (described in Results), the rats were submitted to decapitation and the hypothalamus was rapidly removed 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⁻¹) with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) operated at maximum speed for 30 s. Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9000 g in a 70.Ti rotor (Beckman) at 4°C. The protein concentration of the supernatant 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 IR at 4°C overnight, followed by SDS/PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-phosphotyrosine or anti-IR β antibodies. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts obtained from each tissue were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho-Akt, anti-phospho-AMPK, anti-AMPK α and anti-phospho-ACC antibodies, as described (Calegari *et al.* 2003). In some experiments, rats were pretreated (30 min in advance) with LY 294002 (2 μ l, 50 μ mol l⁻¹).

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean \pm s.e.m. of the indicated number of experiments. The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the ScionCorp software (Scion Image). Student's *t* test for unpaired samples and analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons were used for statistical analysis as appropriate. The *post hoc* test was employed when required. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Metabolic, hormonal and biochemical characterization of rats exposed to cold

As shown in Table 1, the exposure of Wistar rats to a cold environment for two days led to increased mean daily food intake, which was accompanied by weight loss, hypoinsulinaemia and hypoleptinaemia. No significant modulations of blood glucose, TSH and corticosterone levels were detected. Thus, the present model matches most of the previously published characterizations of rodents exposed to cold (Vallerand *et al.* 1987; Gasparetti *et al.* 2003).

Regulation of AMPK molecular activation by fasting and feeding

To evaluate the role of feeding upon the control of hypothalamic AMPK molecular activation, individually housed rats were randomly divided into two groups, fasting and feeding, and used for determination of [Thr¹⁷²] AMPK phosphorylation. The fasting group was

Table 1. Metabolic, hormonal and biochemical characterization of Wistar rats exposed for two days to +4°C

Parameters	Control	74°C
Mean food intake (g (24 h) ⁻¹)	18.9 \pm 1.3	27.2 \pm 2.1*
Body temperature (°C)	36.4 \pm 0.4	36.1 \pm 0.4
Body weight variation (g)	+ 5.0 \pm 0.6	-11.9 \pm 0.8*
Glucose (mg dl ⁻¹)	92.4 \pm 1.3	91.2 \pm 2.0
Insulin (ng ml ⁻¹)	2.55 \pm 0.34	1.32 \pm 0.24*
Leptin (pg ml ⁻¹)	2435 \pm 221	1503 \pm 119*
TSH (ng ml ⁻¹)	13.6 \pm 1.3	13.9 \pm 2.0
Corticosterone (ng ml ⁻¹)	93.5 \pm 3.6	98.3 \pm 4.4

For all parameters; $n = 6$, * $P < 0.05$.

food restricted (maintained only with water *ad libitum*) overnight for 12 h, while the feeding group received water and regular rodent chow *ad libitum* during the same period. As compared to fasted rats, feeding was accompanied by a reduction of 88% ($P < 0.05$) in [Thr¹⁷²] AMPK phosphorylation in the hypothalamus (Fig. 1A). Moreover, feeding was also accompanied by 79% ($P < 0.05$) reduction in [Ser⁷⁹] phosphorylation of ACC, a direct substrate of AMPK (Fig. 1B). There were no significant differences in the amounts of AMPK and ACC between fed and fasting groups.

Cold exposure induces the activation of AMPK in the hypothalamus

To evaluate the effect of cold exposure upon AMPK functional status, non-food-restricted Wistar rats were randomly divided into seven groups. Group 1 was the control, not submitted to cold. Rats in the remaining groups were exposed to cold for 2, 6, 12, 24, 48 and 72 h. After the respective periods of cold exposure, the rats were anaesthetized and the hypothalamus excised for total protein extract preparation. Samples were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and blotted with anti-phospho-[Thr¹⁷²] AMPK. As shown in Fig. 2A, no [Thr¹⁷²] AMPK phosphorylation was observed in control rats. However, beginning at 2 h and reaching the highest levels at 48 h, cold exposure induced [Thr¹⁷²] AMPK phosphorylation in the hypothalamus. Moreover, 48 h cold exposure also induced a significant increase in [Ser⁷⁹] phosphorylation of ACC (Fig. 2B). It is important to notice that in this set of experiments the rats were not food restricted. Therefore, the hyperphagia induced by cold exposure was not sufficient to hamper the effect of cold upon this signalling system.

Cold exposure induces molecular and functional impairment of the anorexigenic signals through AMPK

To test the hypothesis that cold exposure impairs anorexigenic signalling through AMPK, rats were either

maintained at thermoneutrality or exposed to cold for two days. Rats from each group were then divided into fed and fasting (12 h fast). Animals were anaesthetized and the hypothalamus obtained for protein extraction, separation by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-phospho-[Thr¹⁷²]

AMPK or anti-phospho-[Ser⁷⁹] ACC. As depicted in Fig. 3A, cold-exposure led to phosphorylation of AMPK and ACC even in fed rats, suggesting that a molecular pro-orexigenic signal is continuously maintained in

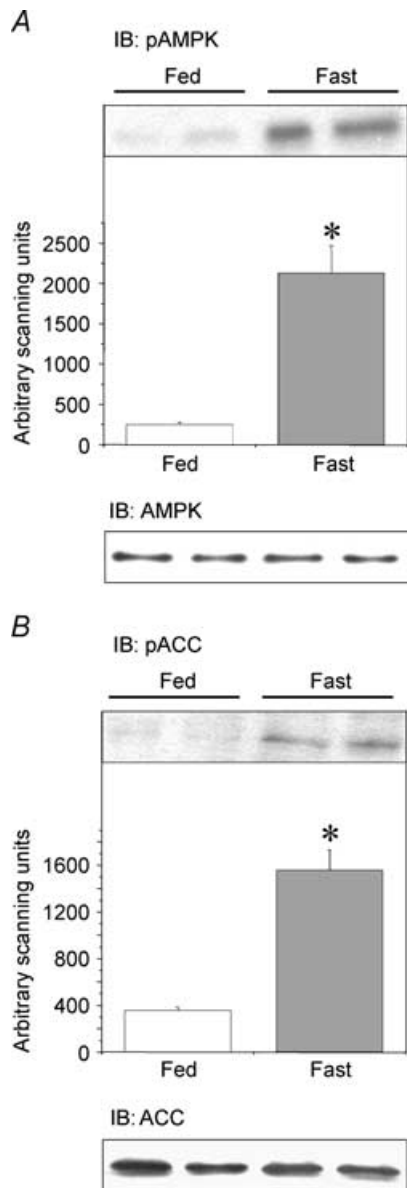


Figure 1. Effect of fasting and feeding upon the expression and molecular functional status of AMPK and ACC in the hypothalamus

The hypothalami of anaesthetized rats maintained on an unrestricted offer of diet (Fed), or food restricted for 12 h (Fast) were homogenized on ice-cold extraction buffer. Aliquots of protein extracts containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-[Thr¹⁷²] AMPK (pAMPK) (A, upper blot) or anti-AMPK (A, lower blot), or anti-phospho-[Ser⁷⁹] ACC (pACC) (B, upper blot) or anti-ACC (B, lower blot). Specific bands were quantified by scanning densitometry and means \pm S.E.M. are plotted as arbitrary scanning units. In all experiments, $n = 5$, * $P < 0.05$ versus Fed.

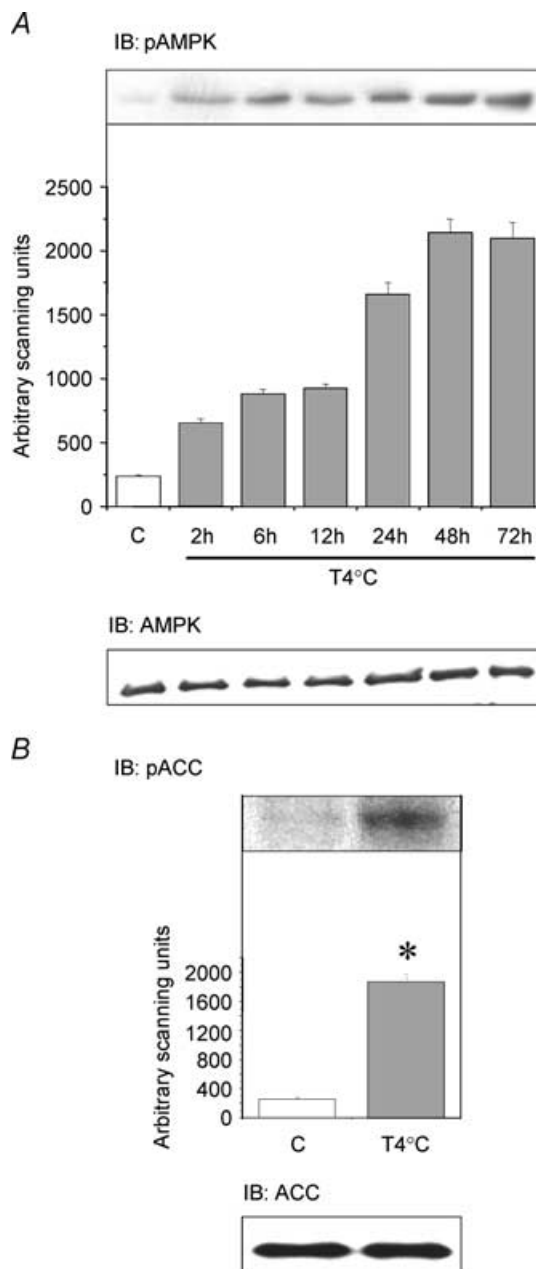


Figure 2. Effect of cold exposure upon the molecular activity of AMPK

A, rats were maintained at thermoneutrality (C) or exposed to a cold environment (T4°C) for progressively longer time-frames (as depicted in the figure). After anaesthesia, hypothalami were obtained for protein extraction. Aliquots of protein extracts containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-[Thr¹⁷²] AMPK (pAMPK) (A, upper blot) or anti-AMPK (A, lower blot), and anti-phospho-[Ser⁷⁹] ACC (pACC) (B, upper blot) or anti-ACC (B, lower blot). In B, rats were exposed to cold for 48 h. Specific bands were quantified by scanning densitometry and means \pm S.E.M. are plotted as arbitrary scanning units. In all experiments, $n = 5$, * $P < 0.05$ versus C.

cold-exposed rats independently of their nutritional state. To determine whether cold exposure would functionally impair nutrient-induced anorexigenic response, control and cold-exposed rats were i.c.v. cannulated and treated with saline, insulin or citrate (an activator of ACC) and evaluated for 12 h for spontaneous food intake. As depicted in Fig. 3B, similarly to the impairment of the insulin-induced anorexigenic molecular signal, there was a significant impairment of the citrate-induced anorexigenic signal ($35 \pm 11\%$ versus $9 \pm 3\%$ reduction of food intake ($P < 0.05$)) demonstrating that at both the molecular and functional level, cold exposure promotes an impairment of the nutrient-induced anorexigenic signal.

Cold exposure induces molecular and functional resistance to insulin action in hypothalamus

Together with leptin, insulin provides the most robust and reproductive anorexigenic signal to the hypothalamus. To evaluate the effect of cold exposure upon insulin action in the hypothalamus, i.c.v. cannulated rats were exposed or not to a cold environment for four days. On the second day the rats were fasted for 6 h and then acutely treated with saline ($2 \mu\text{l}$) or insulin ($2 \mu\text{l}$, 10^{-6} M) i.c.v. Chow was reintroduced, and 12 h food intake was determined. As depicted in Fig. 4A, cold exposure significantly impaired insulin-induced suppression of food ingestion (reduction of $55 \pm 6\%$ versus $11 \pm 4\%$ ($P < 0.05$), for

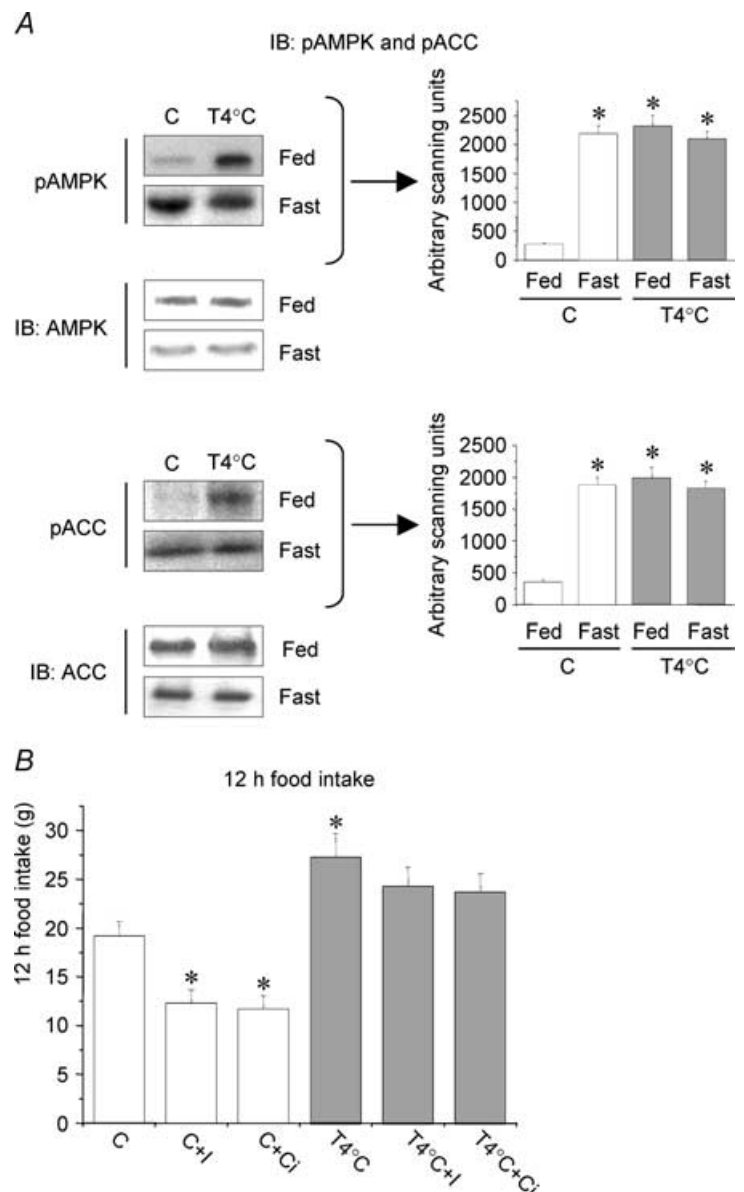
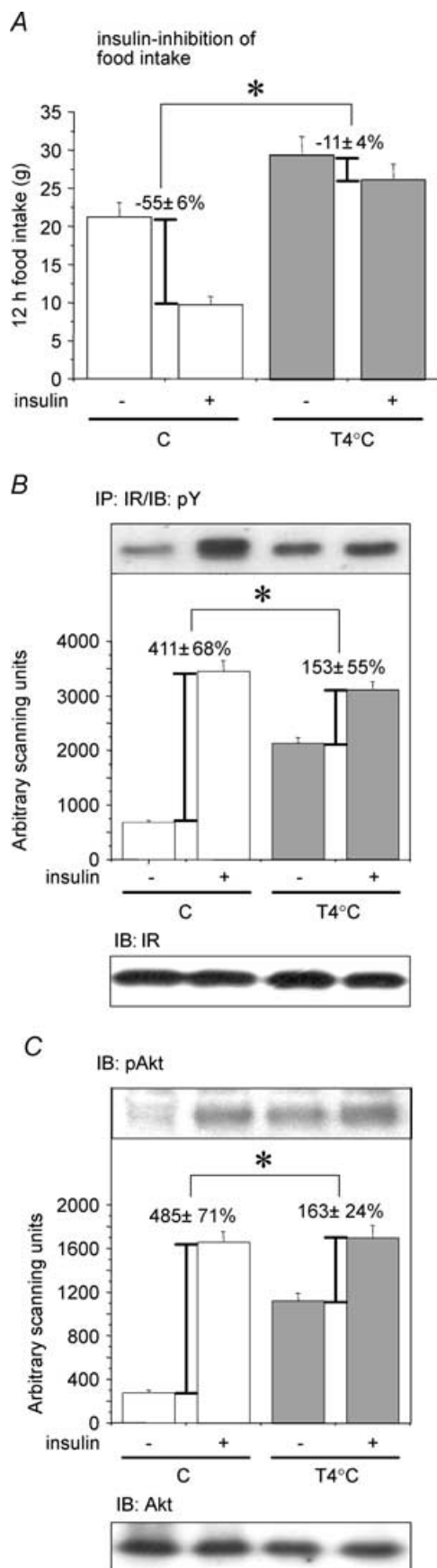


Figure 3. Effect of nutrients on AMPK activity and suppression of feeding

A, rats were divided into two groups, control (C), which were maintained at thermoneutrality; and cold-exposed (T4°C). Some animals were food restricted for 12 h (Fast), while others were not food restricted (Fed). After anaesthesia, hypothalami were obtained for protein extraction. Aliquots of protein extracts containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-[Thr¹⁷²] AMPK (pAMPK) or anti-AMPK; and anti-phospho-[Ser⁷⁹] ACC (pACC) or anti-ACC (as depicted in the figure). Specific bands were quantified by scanning densitometry and means \pm s.e.m. are plotted as arbitrary scanning units. B, i.c.v. cannulated rats were maintained at thermoneutrality (C) or exposed to cold (T4°C). Six hours food restricted rats were treated with an i.c.v. dose of insulin (C + I) $2 \mu\text{l}$, 10^{-6} M, citrate (C + Ci) $2 \mu\text{l}$ containing 200 pmol or saline ($2 \mu\text{l}$) and spontaneous food ingestion was determined over the next 12 h. In all experiments, $n = 5$; in A, $*P < 0.05$ versus C/Fed; in B, $*P < 0.05$ versus C.



control and cold-exposed, respectively). In a parallel series of experiments, four-day cold-exposed or control i.c.v. cannulated rats were fasted for 6 h, anaesthetized and acutely treated with insulin ($2 \mu\text{l}$, 10^{-6} M, i.c.v.) or saline ($2 \mu\text{l}$, i.c.v.). Insulin-induced engagement of IR and Akt were determined by immunoprecipitation and immunoblot experiments. As shown in Fig. 4B, cold exposure significantly reduced insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR, as measured by the difference in tyrosine phosphorylation levels between basal and insulin-stimulated ($411 \pm 68\%$ versus $153 \pm 55\%$ ($P < 0.05$), for control and cold-exposed, respectively). In addition, cold exposure also led to a significant reduction in insulin-stimulated [Ser⁴⁷³] phosphorylation of Akt, which was measured as the difference in [Ser⁴⁷³] phosphorylation levels between basal and insulin-stimulated ($485 \pm 71\%$ versus $163 \pm 24\%$ ($P < 0.05$), for control and cold-exposed, respectively; Fig. 4C).

Cold exposure impairs the cross-talk between PI₃-kinase/Akt and AMPK signalling pathways

Acting through the phosphatidylinositol (PI₃)-kinase/Akt pathway, insulin exerts a negative control upon AMPK (Kovacic *et al.* 2003). To evaluate if the cross-talk between PI₃-kinase/Akt and AMPK signalling pathways plays a role in cold-induced impairment of nutrient-dependent inactivation of AMPK, cannulated, fasting, non-cold-exposed; and fed, cold-exposed rats were treated with the PI₃-kinase inhibitor, LY-294002, and evaluated for insulin-induced inactivation of AMPK. LY-294002 treatment significantly inhibited insulin-induced [Ser⁴⁷³]-Akt phosphorylation both in control and cold-exposed rats (Fig. 5A). These effects

Figure 4. Effect of cold exposure upon insulin-induced inhibition of food intake and insulin signal transduction in the hypothalamus

A, i.c.v. cannulated control (maintained at thermoneutrality) (C) or cold-exposed (T4°C) rats were food restricted for 6 h (from 12 to 18 h). At 18 h, rats received an i.c.v. dose of insulin (+) ($2 \mu\text{l}$, 10^{-6} M), or saline (-) ($2 \mu\text{l}$). Food was reintroduced and total consumption (g) was evaluated during the next 12 h. For evaluation of insulin signalling, i.c.v. cannulated, control and cold-exposed rats were treated with an i.c.v. dose of insulin (+) ($2 \mu\text{l}$, 10^{-6} M), or saline (-) ($2 \mu\text{l}$). Hypothalami were obtained for protein extraction. Aliquots containing 2.0 mg total protein were used in immunoprecipitation (IP) experiments with anti-insulin receptor (IR) antibodies (B). Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with antiphosphotyrosine (pY) antibodies. In addition (C) aliquots containing 0.2 mg total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-[Ser⁴⁷³] Akt (pAkt) antibodies. Specific bands were quantified by scanning densitometry and means \pm s.e.m. are plotted as arbitrary scanning units. In all experiments, $n = 5$; * $P < 0.05$.

were accompanied by inhibition of the insulin-induced reduction of [Thr¹⁷²] AMPK phosphorylation and [Ser⁷⁹] ACC phosphorylation (Fig. 5B). However, this effect was significantly more pronounced in control, fasting rats than in cold-exposed, fed rats (865 ± 55% versus 235 ± 32% increase from insulin alone to insulin + LY294002 (*P* < 0.05), for AMPK phosphorylation in control,

fasting and T4°C, fed, respectively; and 543 ± 67% versus 167 ± 19% increase from insulin alone to insulin + LY294002 (*P* < 0.05), for ACC phosphorylation in control – fasting and T4°C – fed, respectively), suggesting that cold-induced impairment of anorexigenic signals is affected by the cross-talk between PI₃-kinase/Akt and AMPK signalling pathways.

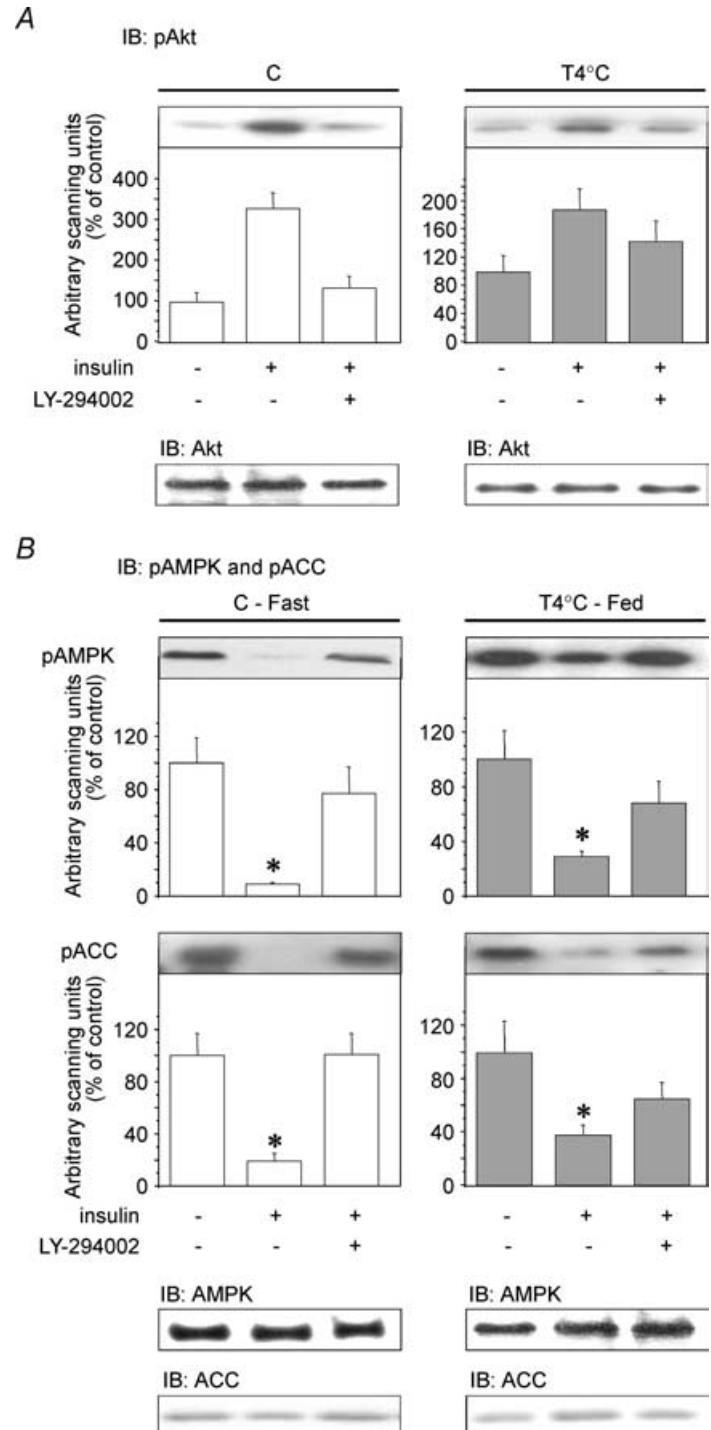


Figure 5. Effect of inhibition of PI₃-kinase on AMPK molecular activation

i.c.v. cannulated rats were anaesthetized and treated with saline (–), insulin (2 μl, 10⁻⁶ M) and/or LY-294002 (30 min in advance, 2 μl, 50 μmol l⁻¹). Hypothalami were obtained for protein extraction. Aliquots of protein extracts containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-[Ser⁴⁷³] Akt antibodies (pAkt) (A, upper blots) or anti-Akt (A, lower blots); anti-phospho-[Thr¹⁷²] AMPK (pAMPK) (B, the first two blots), anti-phospho-[Ser⁷⁹] ACC (pACC) (B, the second two blots), anti-AMPK (B, the third two blots) and anti-ACC (B, the fourth two blots). Specific bands were quantified by scanning densitometry and means ± s.e.m. were used for comparison. In all experiments *n* = 5; **P* < 0.05 versus the respective control –/– (insulin/LY-294002).

Discussion

Physiological regulation of feeding behaviour is, certainly, one of the most important phenomena developed during evolution to warrant organism survival. As in other vital physiological events, here, redundancy and multifactoriality are *sine qua non* requirements for avoiding life-threatening failures in the appropriate response to a lack of nutrient. In this multiplex regulation, the satietogenic effects of nutrients such as glucose, other carbohydrates, fat and aminoacids, and the short-term regulation by gut hormones have been known for quite some time (Blundell & MacDiarmid, 1997; Bray, 2000; Roberts, 2000; Schwartz *et al.* 2000). These mechanisms play an important role in feeding initiation and termination; however, their effects upon long-term feeding control and body adiposity were thought to be scarce.

During the last decade, impressive progress has been made in the characterization of adipostatic factors (Friedman, 2000; Schwartz *et al.* 2000; Flier, 2004). Insulin and leptin have been characterized as the mediators responsible for delivering the most robust signals informing the central nervous system about peripheral energy stores. This allows for an appropriate adjustment of feeding behaviour and thermogenesis (Schwartz *et al.* 2000; Zabeau *et al.* 2003; Flier, 2004). In addition, a recent study by Minokoshi *et al.* (2004) and a subsequent study by Andersson *et al.* (2004) have established a new paradigm in nutrient-dependent control of feeding and adiposity. AMPK is a component of a protein kinase cascade that acts as an intracellular energy sensor (Hardie *et al.* 2003). In the hypothalamus, AMPK is inactivated by both hormonal and nutrient anorexigenic signals and also by the exogenous stimulation of the receptor for melanocortin, a potent anorexigenic neurotransmitter (Minokoshi *et al.* 2004). Moreover, the genetic manipulation of AMPK in the hypothalamus is sufficient to control not only feeding behaviour, but also body weight. Therefore, AMPK seems to act as a link between hormonal and nutritional controllers of feeding and adiposity, and for this reason it has become an attractive potential target for therapeutics in obesity (Minokoshi *et al.* 2004).

In the present study, we have explored the hypothesis that during cold exposure, when there is a higher requirement for energy in order to maintain body temperature, an impairment of the anorexigenic stimulus generated by feeding, would be dependent on AMPK regulation. In the first part of the study, it was confirmed that hypothalamic AMPK activity is modulated by the nutritional status (Minokoshi *et al.* 2004), in such a way that during fasting AMPK is active and delivers a negative signal to ACC. In contrast, after feeding AMPK is rapidly inactivated and ACC activity is restored. In the second

part of the study, cold exposure was shown to be capable, in a time-dependent fashion, of increasing [Thr¹⁷²] AMPK phosphorylation. This effect was accompanied by increased [Ser⁷⁹] ACC phosphorylation. According to the studies by Minokoshi *et al.* (2004), hypothalamic AMPK may participate in the control of neurotransmitter production in at least two subpopulations of neurones; first, in arcuate nucleus NPY/AGRPergic neurones, increasing the production of these orexigenic signalers; and second, in MC4R-expressing neurones of the paraventricular nucleus, negatively controlling the production of putative anorexigenic neurotransmitters. Since the requirement for energy is increased during cold exposure, we suspected that the increased activation of AMPK would play a role in the maintenance of higher feeding even under an unrestricted offer of nutrient. This suspicion was confirmed by the evaluation of the effect of an exogenous inhibitor of AMPK signalling upon food consumption. During this test, it was demonstrated that cold exposure leads to resistance to citrate inhibition of feeding. This phenomenon is paralleled by functional resistance to the anorexigenic effect of insulin, which has been previously reported (Torsoni *et al.* 2003).

In the final part of the study the signal transduction through the PI₃-kinase/Akt pathway was inhibited using the compound, LY-294002, as an attempt to evaluate whether the cross-talk between hormone-dependent and nutrient-dependent anorexigenic signal transducing pathways is affected by cold exposure. Both in control and cold-exposed rats, the inhibition of PI₃-kinase promoted restoration of the insulin-induced inactivation of AMPK. However, the effect was significantly more pronounced in control rats, suggesting that cold exposure may impose a negative control upon the cross-talk between both pathways.

Thus, it is concluded that, during cold exposure, in spite of the reduced blood levels of insulin, there is functional and molecular resistance to nutrient-dependent anorexigenic signal transduction in the hypothalamus of rats. This phenomenon is paralleled by resistance to insulin signal transduction through the PI₃-kinase/Akt signalling pathway, and may participate in the complex mechanism of adjustments of feeding behaviour that might have been developed to warrant increased feeding during the exposure to cold. Moreover, the confirmation of a molecular cross-talk between PI₃-kinase/Akt and AMPK reinforces the importance of AMPK as a potential target for therapeutics in obesity and related diseases.

References

- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D & Small CJ (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* **279**, 12005–12008.

- Blundell JE & MacDiarmid JI (1997). Fat as a risk factor for overconsumption: satiety, satiety, and patterns of eating. *J Am Diet Assoc* **97**, S63–S69.
- Bray GA (2000). Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc* **59**, 373–384.
- Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, Torsoni AS, Franchini KG, Saad MJ & Velloso LA (2003). Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology* **144**, 4586–4596.
- Flier JS (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* **116**, 337–350.
- Friedman JM (2000). Obesity in the new millennium. *Nature* **404**, 632–634.
- Gasparetti AL, De Souza CT, Pereira-Da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM & Velloso LA (2003). Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* **552**, 149–162.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA & Hudson ER (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* **546**, 113–120.
- Jequier E (2002). Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26** (Suppl. 2), S12–S17.
- Kopelman PG (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635–643.
- Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K & Dyck JR (2003). Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* **278**, 39422–39427.
- Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ & Gontijo JA (2002). Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull* **57**, 613–618.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foufelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ & Kahn BB (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569–574.
- Pereira-Da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, Carvalheira JB, Ventrucci G, Marcondes MC, Cruz-Neto AP, Saad MJ, Boschero AC, Carneiro EM & Velloso LA (2003). Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* **144**, 4831–4840.
- Roberts SB (2000). High-glycemic index foods, hunger, and obesity: is there a connection? *Nutr Rev* **58**, 163–169.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ & Baskin DG (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671.
- Scott AM, Atwater I & Rojas E (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* **21**, 470–475.
- Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, De Carvalho-Filho MA, Saad MJ & Velloso LA (2003). Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E216–E223.
- Trinder P (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* **22**, 158–161.
- Vallerand AL, Perusse F & Bukowiecki LJ (1987). Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake. *Am J Physiol* **253**, E179–E186.
- Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J & Tavernier J (2003). The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett* **546**, 45–50.

Acknowledgements

These studies were supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We are indebted to Dr Nicola Conran for English language editing.

Activation of AMPK in rat hypothalamus participates in cold-induced resistance to nutrient-dependent anorexigenic signals

Erika A Roman, Maristela Cesquini, Graziela R Stoppa, José B Carvalheira, Márcio A Torsoni and Lício A Velloso

J. Physiol. 2005;568;993-1001; originally published online Sep 1, 2005;

DOI: 10.1113/jphysiol.2005.095687

This information is current as of January 23, 2006

**Updated Information
& Services**

including high-resolution figures, can be found at:
<http://jp.physoc.org/cgi/content/full/568/3/993>

Permissions & Licensing

Information about reproducing this article in parts (figures, tables)
or in its entirety can be found online at:
<http://jp.physoc.org/misc/Permissions.shtml>

Reprints

Information about ordering reprints can be found online:
<http://jp.physoc.org/misc/reprints.shtml>

3- CONCLUSÃO GERAL

Diversos estudos revelaram-nos que no SNC, o hipotálamo é o principal responsável por controlar o metabolismo energético. Para tanto, esta região do encéfalo é alvo da ação de diferentes moléculas anorexigênicas, dentre elas hormônios (insulina e leptina) e nutrientes (glicose e aminoácido). Tais substâncias estimulam o gasto energético e diminuem a ingestão alimentar, controlando dessa maneira o peso corpóreo. Em situações nas quais ocorre resistência hipotalâmica à sinalização anorexigênica é comum a hiperfagia que, por sua vez, pode levar à obesidade e ao diabetes *mellitus* tipo II.

Dentro desse contexto, os estudos acerca do metabolismo energético têm se tornado uma constante. Recentemente, Hardie et al. (2003) publicaram um trabalho mostrando que a AMPK atua como um sensor energético intracelular.

Minokoshi et al. (2004) mostraram que a ativação da enzima quinase ativada por 5'AMP (AMPK) no núcleo arqueado (ARC), induz à hiperfagia e ao ganho de peso corpóreo, semelhantemente ao que ocorre quando há baixa concentração de insulina e leptina no hipotálamo. Por outro lado, a atividade da AMPK, também em ARC, é inibida por nutrientes, insulina e leptina, sendo que a capacidade deste último hormônio em reduzir a ingestão alimentar parece requerer a inibição da AMPK. Minokoshi et al. (2004) verificaram ainda que a manipulação genética da AMPK é suficiente para controlar a ingestão alimentar e o peso corpóreo.

Em nossos estudos, concluímos que animais homeotérmicos expostos ao frio apresentam resistência central (molecular e funcional) ao sinal anorexigênico da insulina e dos nutrientes. Além disso, a resistência central à insulina, induzida pelo frio, é capaz de prejudicar o “cross-talk” entre as vias de sinalização PI3K-AKT/ AMPK. Este mecanismo pode ser o responsável pela maior ingestão calórica observada nos animais expostos ao frio, mesmo em condições que elevam os níveis circulantes de sinais anorexígenos e termogênicos.

Do ponto de vista fisiológico e bioquímico, a exposição ao frio é uma condição que requer produção de calor nos tecidos e uma maior ingestão de nutrientes energéticos. Neste contexto, os resultados apresentados por este modelo vão ao encontro desta nova condição, desde que permitem ao animal produzir calor e aumentar a ingestão de ração.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe M, Saito M, Ikeda H, Shimazu T. Increased neuropeptide Y content in the arcuate-paraventricular hypothalamic neuronal system in both insulin dependent and non-insulin-dependent diabetic rats. *Brain Res* 1991; 539(2):223-7.

Andersson U, Filipsson K, Abbott C, Woods A, Smith, K, Bloom SR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004; 279:12005-8.

Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005; 146:1428-37.

Baskin DG, Sipols AJ, Schwartz MW, White MF. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* 1994; 134:1952-5.

Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 1999; 31(5):345-50.

Bateman A. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:12-3.

Baura GD, Foster DM, Porte DJr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, et al. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo: a mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 1993; 92(4):1824-30.

Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 54:1362-9.

Best JD, Judzewitach RG, Pfeifer MA, Beard JC, Halter JB, Porte DJr. The effect of chronic sulphonylurea therapy on hepatic glucose production in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31:333-8.

Bing C, Frankish HM, Pickavance L, Wang Q, Hopkins DF, Stock MJ, et al. Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 2):R62-8.

Bogardus C, Lillioja S, Howard BV, Reaven G, Mott D. Relationship between insulin secretion, insulin action and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest* 1984; 74:1238-46.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(25):15043-8.

Campbell P, Mandarino L, Gerich J. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1988; 37:15-22.

Campfield L, Smith F, Gulsez Y, Devos R, Burn P. Mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269:546-9.

Carlson CA, Kim KH. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase. By phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 1973; 248:378-80.

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willet WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994; 17(9):961-9.

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14(7):4902-11.

Cheatham B, Kahn C. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev* 1995; 16:117-42.

Chen Z, Heierhorst J, Mann RJ, Mitchelhill KI, Michell BJ, Witters LA, et al. Expression of the AMP-activated protein kinase beta 1 and beta 2 subunits in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1999; 460:343-8.

Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(1):92-7.

Christopher MJ, Chen ZP, Rantzaou C, Kemp BE, Alford FP. Skeletal muscle basal AMP-activated protein kinase activity is chronically elevated in alloxan-diabetic dogs: impact of exercise. *J Appl Physiol* 2003; 95(4):1523-30.

Colditz GA, Willet WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 1995; 122:481-6.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378(6559):785-9.

Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:35347-54.

Culmsee C, Monning J, Kemp BE, Mattson MP. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation, *J Mol Neurosci* 2001; 17:45-58.

Czech MP. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu Rev Physiol* 1985; 47:357-81.

Da Silva Xavier G, Leclerc I, Salt IP, Doiron B, Hardie DG, Kahn A, et al. Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta-cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:4023-8.

DeFronzo RA, Simonson D, Ferrannini E. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type II (non-insulin-dependent) and type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1982; 23:313-9.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes* 1992; 15:318-68.

Ebihara K, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Masuzaki H, Satoh N, et al. Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 1999; 48(10):2028-33.

Ebina, Y.; Ellis, L.; Jarnagin, K.; Edery, M.; Graf, L.; Clauser, E, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone activated transmembrane signaling. *Cell* 1985; 40(4):747-58.

Firth RG, Bell BM, Marsh HM, Hansen I, Rizza RA. Post-prandial hyperglycaemia in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1986; 77:1525-32.

Flier JS. Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004; 116:337-50.

Gasparetti AL, De Souza CT, Pereira-Da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM, et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 2003; 552:149-62.

Goldstein DE, Curnow RT. Effect of starvation on hepatic glycogen metabolism and glucose homeostasis. *Metabolism* 1978; 27(3):315-23.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1998; 1(4):271-2.

Hardie DG. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochem Soc Symp* 1999; 64:13-27.

Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003; 546:113-20.

Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 1940; 78:149-72.

Himms-Hagen J. Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can j Physiol Pharmacol* 1989; 67:394-401.

Hoo-Paris R, Jourdan ML, Wang LC, Rajotte R. Insulin secretion and substrate homeostasis in prolonged hypothermia in rats. *Am J Physiol* 1988; 255(6 Pt 2): R1035-40.

Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, et al. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 2003; 13(10):861-6.

International Agency For Research On Cancer, World Health Organization. Weight control and physical activity. In: Vainio H, Bianchini F, eds. International Agency for research on Cancer handbooks of cancer prevention. Lyon, France: IARC Press 2002; Vol 6.

Inui A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacol Rev* 2000; 52(1):35-61.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism* 2005; 1:15-25.

Kalra SP, Kalra PS. Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine* 2003; 22(1):49-56.

Kong WM, Stanley S, Gardiner J, Abbott C, Murphy K.; Seth A, et al. A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J* 2003; 17(12):1688-90.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404:635-43.

Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 2003; 278:39422-27.

Kotani K, Carozzi AJ, Sakaue H, Hara K, Robinson LJ, Clark SF, et al. Requirement for phosphoinositide 3-kinase in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209(1):343-8.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Chistjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; 393(6680):72-6.

Lambert PD, Couceyro PR, Mcgirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 1998; 29(4):293-8.

Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* 1994; 266:C319-34.

Leibowitz SF, Hoebel BG. Behavioral Neuroscience And Obesity. In: Bray, G. A.; Bouchard, C. editors. *Handbook of obesity. Etiology and pathophysiology*. New York: Marcel Dekker; 2004. p.301-71.

Li HY, Hwang HW, Hu YH. Functional characterization of cocaine and amphetamine-regulated transcript m RNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 2002; 323(3):203-6.

Malabu UH, Kilpatrick A, Ware M, Vernon RG, Williams G. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of lactating rats: possible relationship to hyperphagia and adaptative changes in energy balance. *Peptide* 1994; 15(1):83-7.

Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 2002; 277(34):30778-83.

Martin SS, Haruta T, Morris AJ, Klippel A, Williams LT, Olefsky JM. Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; 271(30):17605-8.

McCarthy HD, Kilpatrick AP, Trayhurn P, Williams G. Widespread increases in regional hypothalamic neuropeptide Y levels in acute cold-exposed rats. *Neuroscience* 1993; 54:127-32.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; 428:569-74.

Neel JV. The “thrifty genotype” in 1998. *Nutr Rev* 1999; 57:S2-9.

Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2003; 24:1-10.

Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 1980; 3:129-49.

Pereira-Da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* 2003; 144(11):4831-40.

Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, Van Denderen B, Murthy S, Feil SC, et al. AMPK β -Subunit targets metabolic stress-sensing to glycogen. *Curr Biol* 2003; 13(10):867-71.

Qu SY, Yang YK, Ly JY, Zeng Q, Gantz I. Agouti-related protein is a mediator of diabetic hyperphagia. *Regul Pept* 2001; 98(1/2):69-75.

Quon MJ, Chen H, Ing BL, Liu ML, Zarnowski MJ, Yonezawa K, et al. Roles of 1-phosphatidylinositol 3-kinase and ras in regulating translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Cell Biol* 1995; 15(10):5403-11.

Rexrode KM, Hennekens CH, Willet WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* 1997; 277:1539-45.

Sakaue, H.; Ogawa, W.; Takata, M.; Kuroda, S.; Kotani, K.; Matsumoto, M, et al. Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone- or hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 1997; 11(10):1552-62.

Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 2002; 12:65-71.

Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 1992; 130(6):3608-16.

Schwartz MW, Woods SC, Porte JrD, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404:661-71.

Schlessinger J. Cellular signaling by receptor tyrosine kinases. *Harvey Lect* 1993; 89: 105-23.

Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, et al. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 2004; 113(2):274-84.

Seidell JC, Verschuren WM, Van Leer EM, Kromhout D. Overweight, underweight, and mortality. A prospective study of 48,287 men and women. *Arch Intern Med* 1996; 156: 958-63.

Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001; 104:531-43.

Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI, Nicholl JK, Fernandez CS, Michell BJ, et al. AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett* 1997; 409(3):452-6.

Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89:2522-5.

Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Rev* 1954; 61: 5.

Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, De Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E216-23.

Trayhurn P, Ashwell M, Jennings G, Richard D, Stirling DM. Effect of warm or cold exposure on GDP binding and uncoupling protein in rat brown fat. *Am J Physiol* 1987; (Endocrinol Metab 15):E237-43.

Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem* 1999; 72:1707-16.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; 313(6005):756-61.

Vallerand AL, Jacobs I. Energy metabolism during cold exposure. *Int J Sports Med* 1992; 13(1):S191-3.

Van Der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10:251-337.

Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE, et al. Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'AMP-activated kinase in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1997; 272(20):13255-61.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:12490-5.

Volkoff H, Peter RE. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y – and orexin A – induced feeding. *Brain Res* 2000; 887(1):125-33.

Wang J, Leibowitz KL. Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Res* 1997; 777(1/2):231-6.

Wang C, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Effects of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* 2000; 11(14):3251-5.

Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, et al. Recombinant *ob* protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. *J Clin Invest* 1995; 96(4):2065-70.

Weiss FU, Daub H, Ullrich A. Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7(1):80-6.

Woods SC, Lotter E, McKay L, Porte DJ. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979; 282:503-5.

Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 2000; 16(10):894-902.

Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(4):E838-45.

5- APÊNDICE



MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar de oito semanas de idade, proveniente do Biotério Central da Unicamp (Cemib), os quais foram alimentados com ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1) da Nuvital, oferecida *ad libitum*, assim como água. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro / escuro de 12 horas) e temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

Os animais foram randomicamente divididos em 11 grupos, a saber: I - Animais, em temperatura ambiente, tratados com ração e água *ad libitum*; II - Animais em jejum (6 e 12 h) em temperatura ambiente; III – Animais alimentados *ad libitum* expostos ao frio (4°C) por 2, 6, 12, 24, 48 e 72h; IV – Animais em jejum (12h) expostos ao frio (48h); V – Animais, em temperatura ambiente, tratados com citrato na dose de 200 μmol ; VI – Animais, expostos ao frio, tratados com citrato na dose de 200 μmol ; VII – Animais, em temperatura ambiente, tratados com insulina na dose de 10^{-6}M ; VIII – Animais, expostos ao frio, tratados com insulina na dose de 10^{-6}M ; IX – Animais, em temperatura ambiente, tratados com LY-294002 na dose de 50 μmol 10^{-1}M e insulina na dose de 10^{-6}M ; X – Animais, expostos ao frio, tratados com LY-294002 na dose de 50 μmol 10^{-1}M e insulina na dose de 10^{-6}M ; XI – Animais tratados com salina.

Cirurgia estereotáxica

Ao atingirem oito semanas de idade, os ratos foram submetidos à cirurgia para a implantação da cânula no ventrículo lateral do hipotálamo. Os animais (250 – 300g) foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de 1:1 (0,8 mL) de cloridrato de cetamina (50 mg / mL) e diazepam (5,0 mg / mL). Depois de testados, os reflexos pedal e corneal os animais foram posicionados no aparelho de estereotaxia para implantação da cânula, seguindo as coordenadas do Atlas Paxinos-Watson (Paxinos et al., 1980) que variam de acordo com o peso do animal. Em ratos de, aproximadamente, 300g as coordenadas utilizadas foram AP: 0,2 mm; Lateral: 1,5 mm; Profundidade: 4 mm.

Infusão intracerebroventricular

Após o período de uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a um teste de resposta de ingestão hídrica subsequente ao tratamento com angiotensina II (2,0 µL ICV de solução 10^{-6} M) para avaliação da adequação da posição da cânula. Ratos com resposta positiva a angiotensina II foram selecionados e utilizados nos experimentos. Animais de cada situação experimental receberam 2,0 µL ICV de citrato, LY-294002 e insulina nas concentrações descritas anteriormente.

Para a infusão intracerebroventricular das drogas ou salina foi utilizada uma seringa Hamilton (50 µL) acoplada, por meio de uma cânula plástica, a uma agulha 30 G, de modo que esta ultrapassasse o comprimento da cânula metálica (0,1 – 0,2 mm), garantindo a entrada do líquido no ventrículo lateral.

Avaliação da ingestão alimentar

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e mantidos em jejum por 12 horas. Às 18 h os ratos foram submetidos aos diferentes tratamentos por via ICV e a ingestão de 12 horas foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola.

Dissecção do hipotálamo

Os animais foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal de tiopental sódico (0,6 mL; 15 mg / Kg) e a perda dos reflexos pedal e corneal foi utilizada como controle da anestesia. Após os diferentes tratamentos, o crânio foi aberto, o hipotálamo retirado e, em seguida, homogeneizado em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização (1 % Triton X-100; 100 mM Tris pH 7,4; contendo 100 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio; 10 mM de vanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg de aprotinina / mL) a 4 °C em “Politron PTA 20S generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. O homogeneizado

foi então centrifugado a 11.000 rpm por 20 minutos para remoção de material insolúvel. No sobrenadante, foi determinada a concentração de proteínas, utilizando-se o método de Bradford (1976).

Imunoprecipitação

Nos experimentos nos quais se desejava verificar a fosforilação de proteínas, das quais não havia anticorpos específicos fosforilados, ou, quando se desejava verificar associação entre proteínas, foi empregado o método de imunoprecipitação. As amostras solubilizadas foram centrifugadas a 11.000 rpm por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi retirado para imunoprecipitação. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas, a 4 °C. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A sepharose 6 MB por 2 horas a 4 °C e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4 °C / 11.000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2,0 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100). O sobrenadante foi descartado restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (Velloso et al., 1996). Os imunocomplexos foram ressuspenso em 25 µL de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol / L de DTT.

“Imunoblot”

Após rápida fervura (5 minutos) as amostras, tanto de imunoprecipitado quanto de extrato total (contendo 0,2 mg de proteína total), foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD durante 120 min a 80 Volts, em gelo, e banhadas com tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com anticorpo específico. A ligação do anticorpo a proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação das membranas de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado; 10 mmol / L de Tris, 150 mmol / L de NaCl, 0,02 % de Tween 20) por

1,5 hora. A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por meio de tratamento com ^{125}I -proteína A em 10 mL de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 36 – 72 horas. Após a revelação das auto-radiografias, as bandas obtidas foram quantificadas por meio de densitometria óptica (Velloso et al., 1996; Araújo et al., 2005).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Quando comparados dois grupos, foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados. Quando necessário, utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida de teste para comparação múltipla de médias. Foi adotado o nível de significância $p < 0.05$.