

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

Gisele de Castro

**OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DESENCADEIA ESTRESSE DO
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E RESISTÊNCIA À INSULINA EM AMÍGDALA
DE RATOS**

LIMEIRA,
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

Gisele de Castro

OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DESENCADEIA ESTRESSE DO
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E RESISTÊNCIA À INSULINA EM AMÍGDALA
DE RATOS

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas para obtenção do Título de
Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte
e Metabolismo, na área de Metabolismo e
Biologia Molecular.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO/TESTE DEFENDIDA PELO(A) ALUNO(A)

Gisele de Castro
E ORIENTADA PELO(A) PROF(A). DR(A).
Patrícia de Oliveira Prada

M. Degani
PROF. DR. MARCOS HENRIQUE DEGANI
Coordenador de Pós-Graduação
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp - Limeira
Matrícula 296777

Orientadora: Prof (a). Dr (a). Patrícia de Oliveira Prada

LIMEIRA,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

C279o Castro, Gisele de, 1987-
Obesidade induzida por dieta desencadeia estresse do retículo endoplasmático e resistência à insulina em amígdala de ratos / Gisele de Castro.
– Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Patrícia de Oliveira Prada.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Insulina. 2. Amígdalas. 3. Obesidade. 4. Inflamação. 5. Estresse de retículo endoplasmático. I. Prada, P. O. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in amygdala of rats

Palavras-chave em inglês:

Insulin

Amygdala

Obesity

Inflammation

Endoplasmic reticulum stress

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Patrícia de Oliveira Prada [Orientador]

Eduardo Rochete Ropelle

Jackson Cioni Bittencourt

Data de defesa: 09-08-2013

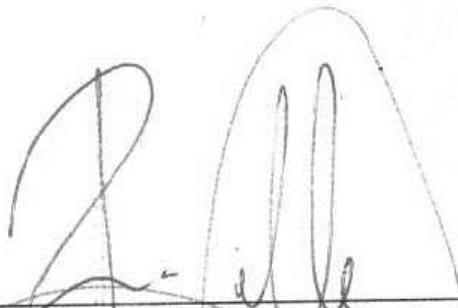
Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Limeira, 09 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA



Patrícia de Oliveira Prada
Presidente da Comissão Julgadora



Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle



Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Tendo a consciência de que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade, amor e paciência demonstrados e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo dessa caminhada foram surgindo.

Ao Rodrigo, meu noivo, meu grande companheiro, pelo amor, carinho, respeito e compreensão, me deixando mais tranquila nos momentos mais difíceis, por ter me aturado nos momentos de estresse, e por tornar minha vida cada dia mais feliz.

À Professora Patrícia de Oliveira Prada, pela sua orientação, apoio, disponibilidade, pelas opiniões e críticas e colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

Às minhas amigas, Laís Weissmann, Paula Quaresma, Andressa de Cássia entre outros que não menciono o nome, mas que sabem que são amigos que estiveram ao meu lado, durante esta fase, pelo companheirismo, ajuda, força e apoio em todos os momentos.

Aos funcionários do laboratório de investigação clínica em resistência á insulina (LICRI) Dioze, Luís, Jósimo, Sandra e Andrey pela atenção e o apoio técnico.

Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.

RESUMO

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, acarretando diversas alterações metabólicas. Estas alterações influenciam o controle do balanço energético. O hipotálamo é considerado o órgão chave para o controle do balanço energético. Recebe informações da periferia por meio de nutrientes, sinais neurais e hormônios. Dentre estes hormônios, a insulina participa do controle da ingestão alimentar, tendo efeitos anorexigênicos. Esta regulação ocorre pela ativação de sua via de sinalização IR/PI3q/Akt. Em animais obesos ocorre uma menor ativação desta via como consequência ao estresse do retículo endoplasmático e ativação de proteínas da via inflamatória. No presente estudo destacamos a amígdala como uma importante região do sistema nervoso central envolvida na regulação da ingestão alimentar em resposta à insulina. Essa regulação foi dependente da ativação da via PI3q, pois a injeção de LY aboliu os efeitos da insulina no controle da ingestão. A insulina diminuiu os níveis de RNAm do neuropeptídeo orexigênico NPY e aumentou os níveis do RNAm do neuropeptídeo anorexigênico ocitocina na amígdala de animais controles via PI3q, o que pode ter contribuído para a hipofagia. Além disso, em animais obesos não houve redução na ingestão alimentar em resposta a insulina e a fosforilação da Akt foi diminuída na amígdala, sugerindo resistência à insulina nessa região do sistema nervoso central. A resistência à insulina foi associada com o estresse do retículo endoplasmático e inflamação na região da amígdala. A inibição do estresse do retículo endoplasmático com PBA (ácido fenil butírico), inibidor do estresse de retículo, reverteu a ação e sinalização da insulina, diminuindo a expressão do RNAm do NPY e aumentando a expressão do RNAm da ocitocina na amígdala de animais obesos. Em conjunto, os resultados sugerem que a amígdala é sensível a ação anorexigênica da insulina, sendo este efeito dependente da via PI3q. A ação da insulina na amígdala provavelmente modula a ingestão por alterar os níveis de neuropeptídeos como NPY e ocitocina. Animais obesos apresentam resistência à ação e sinalização da insulina em amígdala. O mecanismo molecular pelo qual ocorre resistência à insulina parece estar relacionado à ativação da via inflamatória e ao estresse de retículo endoplasmático.

ABSTRACT

Insulin acts in hypothalamus decreasing food intake (FI) by IR/PI3K/Akt pathway. This pathway is impaired in obese animals and endoplasmic reticulum (ER) stress and low grade inflammation are possible mechanisms involved in this impairment. Here, we highlighted amygdala as an important brain site of FI regulation in response to insulin. This regulation was dependent on PI3K/AKT pathway similar to the hypothalamus. Insulin was able to decrease NPY and increase oxytocin mRNA levels in the amygdala via PI3K, which may contribute to hypophagia. Additionally, obese rats did not reduce FI in response to insulin and AKT phosphorylation was decreased in the amygdala, suggesting insulin resistance. Insulin resistance was associated with ER stress and low grade inflammation in this brain region. The inhibition of ER stress with PBA reverses insulin action/signaling, decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels in the amygdala from obese rats, suggesting that ER stress is probably one of the mechanisms that induce insulin resistance in the amygdala.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ação da insulina no hipotálamo na regulação do balanço energético.

Figura 2. Ação da insulina no controle do ritmo de disparos neuronais.

Figura 3. A amígdala e suas três subdivisões anatômicas e funcionais.

Figura 4. Mecanismo de ativação da via inflamatória e estresse do retículo endoplasmático culminando com resistência à insulina.

LISTA DE ABREVIATURAS

IR- Receptor de Insulina
IRS- Substrato do receptor de insulina
PI3q -fosfatidilinositol-3-quinase
Akt – protein kinase B
Foxo1- forkhead box
AgRP- *agouti-related protein*
POMC- *pro-opiomelanocortin*
NPY- *neuropeptide Y*
CRH- *corticotrophin-releasing hormone*
PVN- núcleo paraventricular
JAK2- janus quinase-2
STATs- transdutores-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição
NAc- núcleo accumbens
VTA- área tegmental ventral
DA- dopamina
DAT- transportador de dopamina
Th- tirosina hidroxilase
FMRI- ressonância magnética funcional
CeA- núcleo central da amígdala
IKK α/β - I kapa B kinase α/β
NF κ B- factor nuclear kappa B
JNK- c-Jun amino-terminal kinase
RE- retículo endoplasmático
Ca²⁺ - cálcio
UPR- *Unfolded Protein Response*
PERK- (PKR-like eukaryotic initiation factor2 α kinase)
IRE1 α - (inositol requiring enzyme)
ATF6- (activating transcription factor-6)
PBA- ácido fenil-butírico
PKC θ - protein kinase C theta

SUMÁRIO

Resumo V

Abstract VI

1- Introdução..... 10

2- Objetivos 20

3- Artigo 22

3.1- Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in amygdala of rats.

4- Discussão 52

5- Resumo dos Resultados 56

6- Conclusão 58

7- Referência Bibliográfica 60

8- Anexos 69

A obesidade é caracterizada por um excesso de gordura acumulada no tecido adiposo e demais órgãos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que em 2008, 1,5 bilhão de adultos com idade superior a 20 anos estavam acima do peso e mais de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres, aproximadamente 10% da população adulta, eram obesos. Em 2010, 43 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos estavam acima do peso.^[1]

No Brasil, estudos de base populacional realizados entre os anos de 1974 e 2003, permitiram avaliar os agravos nutricionais mais relevantes, incluindo a emergência da obesidade e constatar seus principais determinantes. Segundo esses estudos, a prevalência da desnutrição em crianças e adultos foi reduzida nas últimas décadas, enquanto o sobrepeso e a obesidade aumentaram na população brasileira, principalmente entre os adultos. Dados recentes da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) revelam que cerca de 40% dos adultos no Brasil estão com excesso de peso, e que 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres são obesos.^[70]

O aumento da obesidade está associado ao aumento de comorbidades relacionadas ao ganho de peso como diabetes, hipertensão, doença coronariana, apneia do sono e câncer. Além da inatividade física, a obesidade é causada principalmente pelo excesso de ingestão alimentar. Modificações no estilo de vida, na dieta e exercício têm sido recomendadas, porém embora efetivas em curto prazo, as recidivas no ganho de peso são muito frequentes. Além disso, o desenvolvimento de medicamentos para tratar a obesidade vem apresentando baixa eficácia e sérios efeitos colaterais.^[1]

O balanço energético é mantido por diversos mecanismos, incluindo sinais metabólicos e hormonais, sinalização celular e molecular e sinais neurais. A identificação de hormônios periféricos como insulina, leptina e outros, assim como nutrientes que atuam em neurônios hipotalâmicos para controlar a homeostase energética tem auxiliado o entendimento dos circuitos neuronais que controlam o peso corporal.^[7, 34, 52, 56, 58, 42, 33]

A ação da insulina no hipotálamo na regulação do balanço energético tem sido bem descrita na literatura^[69, 52]. A insulina sinaliza através do seu receptor (IR) que sofre uma modificação conformacional, ativando a subunidade β ^[69]. Uma vez ativo, este sítio catalisa a fosforilação em tirosina de proteínas que contém o domínio SH2, como por

exemplo, os substratos do receptor de insulina (IRS), principalmente IRS-1 e IRS-2. A fosforilação de IRSs promove a ligação e ativação da enzima phosphoinositide 3-kinase (PI3K) que ativa a protein kinase B (Akt). A Akt ativada fosforila e retira o fator de transcrição forkhead box (Foxo1) do núcleo. A ativação dessas proteínas pela insulina controla o ritmo de disparos neurais ^[35] (Fig 1), o que é condicionado à ativação de canais de potássio ATP – dependentes.

Figura 1

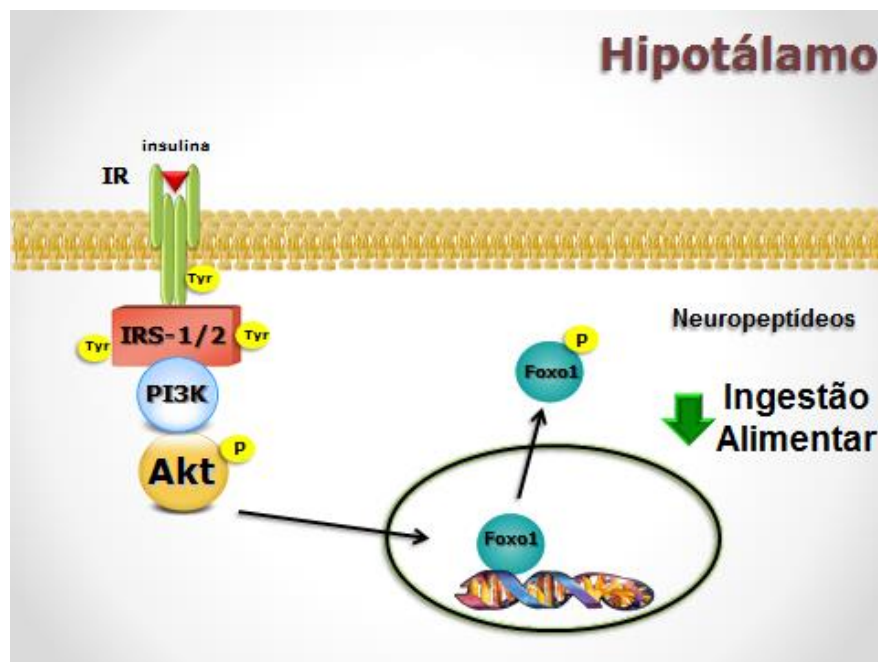


Figura 1. Ação da insulina no hipotálamo na regulação do balanço energético.

Através do controle do ritmo de disparos neuronais, a insulina modula a liberação de neurotransmissores em sinapses efectoras ^[52]. Além disso, a fosforilação da Foxo1 induzida por insulina tem sido associada com a regulação da expressão dos neuropeptídeos *agouti-related protein* (AgRP) e *pro-opiomelanocortin* (POMC), ligados ao controle da homeostase energética. No núcleo arqueado a insulina inibe a transcrição do AgRP e do *neuropeptide Y* (NPY), sendo estes neuropeptídeos orexigênicos ^[7] (Fig 2). Por outro lado, a hiperinsulinemia aumenta a expressão de RNAm do *corticotrophin-releasing hormone* (CRH) no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo ^[13], o que pode contribuir com a hipofagia ^[24].

Figura 2

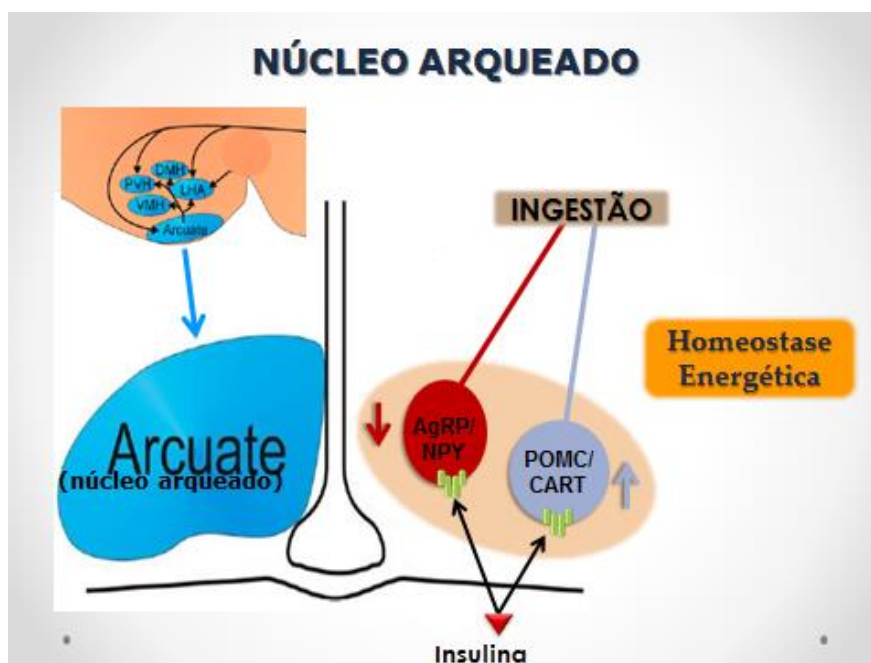


Figura 2. Ação da insulina no controle do ritmo de disparos neuronais.

A segunda via pela qual a insulina modula a ingestão alimentar e termogênese depende da ativação da enzima janus kinase-2 (JAK2). Apesar de possuir atividade tirosina quinase intrínseca, o IR é capaz de interagir com, e ativar, a JAK2 principalmente em hipotálamo. Uma vez fosforilada e ativada, a JAK2 recruta e fosforila signal transducers and activators of transcription (STATs), predominantemente STAT3, a qual conecta o sinal da insulina ao controle da transcrição de genes de neurotransmissores envolvidos com o controle da fome e da termogênese.

Estudos realizados em roedores nos últimos 11 anos demonstraram a importância das proteínas da via de sinalização de insulina no sistema nervoso central no controle do balanço energético.

Camundongos *knockouts* para o receptor de insulina especificamente em neurônios do sistema nervoso central desenvolvem obesidade e infertilidade ^[9]. Adicionalmente, demonstrou-se que a inibição temporária de IR com oligonucleotídeoantisense em hipotálamo induz hiperfagia e aumento da adiposidade em ratos ^[44]. De maneira similar, a inibição de proteínas da via de sinalização de insulina distais ao IR também está relacionada a alterações na ingestão alimentar. Camundongos *knockouts* para IRS-2 são

hiperfágicos e obesos, assim como a inibição da expressão da PI3q ou Foxo1 em hipotálamo alteram a ingestão alimentar de formas variadas ^[55].

Embora a maior parte dos estudos tivesse como foco a sinalização de insulina no hipotálamo, recentes evidências têm demonstrado que a insulina tem efeitos diretos em outras regiões do sistema nervoso, regiões estas que compreendem o sistema mesolímbico de recompensa. Este sistema compreende o núcleo accumbens (NAc), córtex pré-frontal, área tegmental ventral (VTA), hipocampo, striatum e amígdala. ^[66, 63, 14]

A amígdala apresenta três subdivisões anatômicas e funcionais, o grupo medial de subnúcleos que apresenta extensas conexões com o bulbo olfatório e com o córtex olfativo, o grupo basolateral que apresenta conexões importantes com o córtex cerebral e o grupo de núcleos central e anterior, o qual caracteriza-se por conexões com o hipotálamo e com o tronco encefálico. Dessa forma a amígdala une regiões corticais que processam informação sensorial com sistemas efetores hipotalâmicos e do tronco encefálico. As vias originárias de áreas corticais sensoriais distinguem a amígdala do hipotálamo, pois este recebe sinais sensoriais relativamente não processados. Alguns dos núcleos talâmicos que recebem sinais do bulbo olfatório e núcleos de retransmissão de sinais sensoriais viscerais no tronco encefálico direcionam diretamente sinais sensoriais à amígdala. Sendo assim, muitos neurônios na amígdala respondem a estímulos visuais, auditivos, sensoriais somáticos, sensoriais viscerais, gustativos e olfativos. A amígdala desempenha um papel importante na expressão do comportamento emocional, através das projeções para o hipotálamo e o tronco encefálico influenciando assim na atividade dos sistemas motores efetores somáticos e viscerais ^[54] (Fig 3).

Figura 3

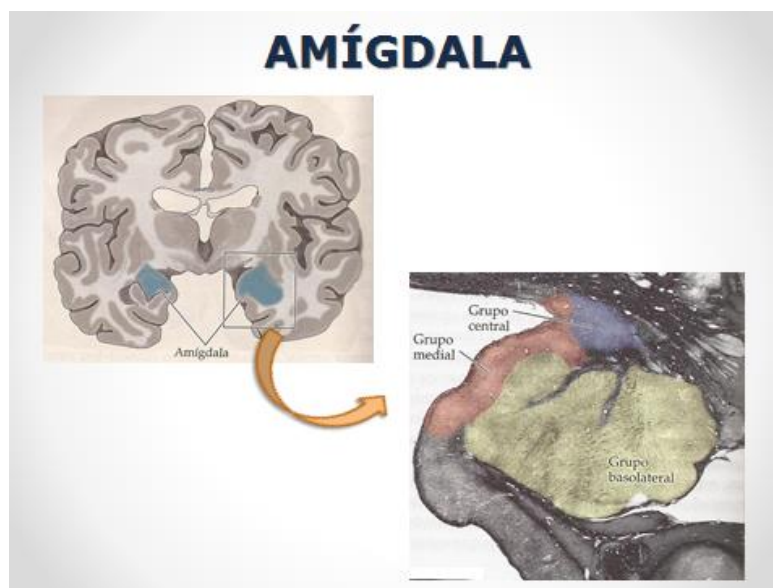


Figura 3. A amígdala e suas três subdivisões anatômicas e funcionais.

(Purves, et al. 2010)

O sistema mesolímbico dopaminérgico vem sendo reconhecido por seu papel central na motivação comportamental, recompensa, processos cognitivos e mais recentemente na regulação da alimentação hedônica. Alimentação hedônica é a ingestão regulada pelo prazer e está associada aos níveis de dopamina. ^[2]

A ingestão de alimentos palatáveis aumenta a liberação de dopamina na região do VTA a qual ativa vias neurais que vão estimular outras estruturas do sistema mesolímbico como a amígdala ^[72]. A liberação de dopamina (DA) nas fendas sinápticas das regiões do sistema límbico aumenta a sensação de recompensa e pode ser modulada por sinais hormonais como a insulina. ^[13]

Poucos estudos têm investigado a relação entre as mudanças fisiológicas e patológicas dos níveis de insulina e a homeostase da DA. No sistema nervoso central a insulina vem sendo demonstrada como fator regulatório da sinalização dopaminérgica levando a redução da resposta límbica em regiões do sistema de recompensa frente ao estímulo de alimentos em humanos. Em indivíduos saudáveis, a insulina reduz a ativação das regiões do hipocampo, córtex frontal e visual em resposta à imagem de alimentos. ^[67] Estudos demonstraram que a inibição de componentes da via de sinalização da insulina como PI3q e Akt reduzem drasticamente a expressão do transportador de dopamina (DAT) e o clearance de DA. ^[13]

Konner et al (2011) demonstraram que o IR é co-expresso com a enzima tirosina hidroxilase (Th) que é um marcador de neurônios dopaminérgicos. Assim, esses autores sugeriram uma potencial ligação entre o controle de ingestão alimentar e o sistema de recompensa através da insulina. Ainda neste artigo, a inativação do IR em células que expressam Th no VTA, através de manipulação gênica, resultou em obesidade e hiperfagia. ^[35]

Assim como o VTA, estudos anteriores identificaram a região da amígdala como uma possível área de regulação da ingestão alimentar. A amígdala é uma região tradicionalmente estudada por seu papel em comportamento como medo e ansiedade, porém mais recentemente tem se tornado foco de alguns estudos por sua influência na ingestão alimentar ^[15]. Esta região parece ter um papel importante no desenvolvimento de aversão ou de recompensa à determinados alimentos ^[21, 60, 73]. Também está envolvida na seleção de alguns macronutrientes, pois lesões na amígdala alteram a preferência por macronutrientes ^[31]. Redução no consumo de lipídios foi observada pela administração, na amígdala, de enterostatina ou agonista de receptor de melanocortina 4 ^[4, 74]. Entretanto, quando era administrado antagonista de receptor de melanocortina 4 observou-se aumento do consumo de lipídios ^[5, 18].

Em humanos, estudos que empregaram ressonância magnética funcional (fMRI) demonstraram que o padrão de resposta na amígdala a estímulos com imagem de alimentos foi similar ao observado no hipotálamo ^[18]. Em obesos, observou-se elevada atividade nessa região em resposta a estímulos com imagem de alimentos em indivíduos portadores da síndrome Prader–Willi com obesidade grave ^[61, 27]. A injeção intravenosa de grelina, hormônio orexigênico, aumenta a atividade da amígdala em resposta à imagem de alimentos ^[41].

Em roedores, estudos demonstraram que lesões na amígdala alteram a ingestão alimentar e o peso corpóreo.

King et al (1994) verificaram que lesões bilaterais na região postero-dorsal da amígdala resultavam em hiperfagia e excesso de ganho de peso em ratas. Em outro estudo, King et al (1996) observaram que em paralelo à hiperfagia e ganho de peso, as lesões da amígdala induziam hiperinsulinemia mesmo em ratas alimentadas com dieta padrão.

Mais recentemente, Boghossian et al (2009) demonstraram que a administração de injeções de insulina na região do CeA (núcleo central da amígdala) não induziam anorexia em ratos Sprague-Dawley recebendo dieta hiperlipídica. Assim, sugeriram que a amígdala é uma região importante para o controle da ingestão alimentar pela insulina e que animais obesos têm alteração dessa regulação ^[8]. De fato, a amígdala expressa IR em abundância ^[23], no entanto, a sinalização desse hormônio ainda não foi investigada nessa região do sistema nervoso central.

Portanto, seria interessante investigar se os mesmos eventos de sinalização insulínica também ocorrem na amígdala e se esta sinalização está envolvida na regulação da ingestão alimentar. Nesse sentido, **o primeiro objetivo do presente estudo é investigar a expressão e grau de fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina, assim como a modulação da ingestão alimentar após estímulo com insulina na região da amígdala em animais controles.** De forma complementar, **o segundo objetivo do estudo é investigar se o bloqueio farmacológico da via da PI3q, com LY24002, na amígdala altera a resposta à insulina quanto à ingestão alimentar e sinalização intracelular de insulina de animais controles.** O terceiro objetivo é **investigar se a insulina, através da via PI3q modula a expressão de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos em animais controles.**

O consumo de dieta hiperlipídica tem sido associado à resistência à insulina no hipotálamo. Os estudos sugerem que esta resistência é decorrente da redução da ativação da via IRSs/PI3q/Akt nessa região do sistema nervoso ^[50,51]. **Assim, o quarto objetivo do presente estudo foi investigar se havia resistência à insulina na amígdala de animais com obesidade induzida por dieta.**

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que a obesidade produz um estado de inflamação crônica subclínica, caracterizado por níveis circulantes elevados de citocinas pro-inflamatórias e infiltração de macrófagos no tecido adiposo ^[28]. Muitas destas citocinas liberadas bloqueiam a ação da insulina em vários tecidos, incluindo hipotálamo. Um dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desencadeamento de resistência à insulina é a ativação da via inflamatória I kappa B kinase α/β (IKK α/β)/ I κ B/ fator nuclear kappa B (NF κ B) ^[28]. No hipotálamo, ativação da via IKK/I κ B/NF κ B e resistência à insulina ocorre devido a IKK β ativada induzir a fosforilação em serina dos IRSs. Este evento bloqueia o

sinal da insulina e constitui um dos elementos indutores de resistência hipotalâmica à insulina desencadeada por obesidade [77].

Em paralelo à ativação da via inflamatória, o estresse de retículo endoplasmático (RE) tem sido descrito como outro mecanismo desencadeador de resistência à insulina [45] (Fig 4).

Figura 4

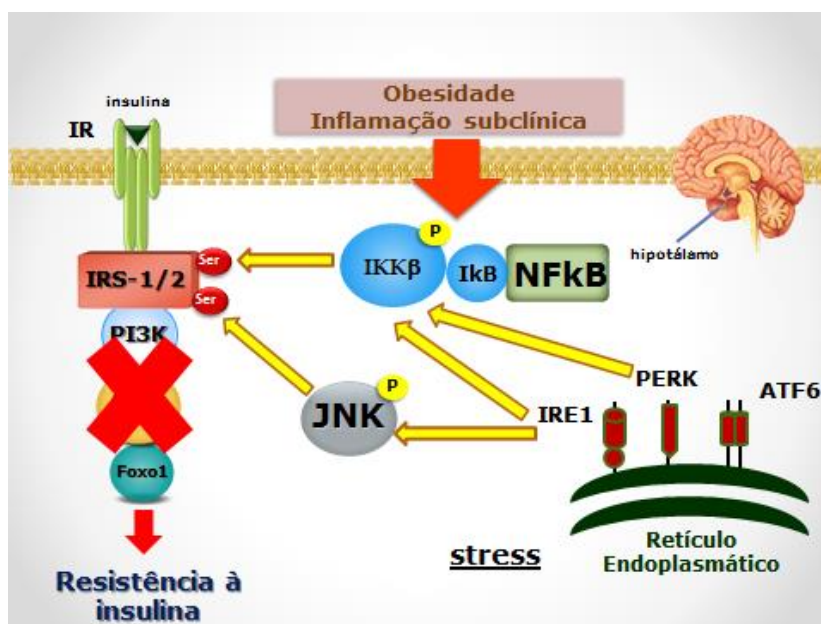


Figura 4. Mecanismo de ativação da via inflamatória e estresse do retículo endoplasmático culminando com resistência à insulina.

O RE é uma organela citoplasmática responsável pela síntese, maturação e locomoção de um grande número de proteínas sendo também um sítio crítico de homeostase de cálcio (Ca^{2+}).

O estresse de RE foi descrito como potente mecanismo desencadeador de resistência à insulina em tecidos periféricos e também em hipotálamo [45, 46, 47, 48, 49]. A obesidade e dieta rica em lipídeos podem desencadear uma resposta adaptativa conhecida como *Unfolded Protein Response* (UPR). Esta resposta aumenta a fosforilação de proteínas associadas à membrana do RE como a, PERK (PKR-like eukaryotic initiation factor2 α kinase), IRE1 α (inositol requiring enzyme) e ATF6 (activating transcription factor-6) [50]. A atividade endorribonuclease da IRE1 α cliva o RNAm da X-box binding protein-1 (XBP1) tornando-a ativa na forma do fator de transcrição (XBP1). No reticulo endoplasmático o XBP1 sozinho ou em conjunto com o ATF6 estimula a produção de chaperonas e proteínas envolvidas

na biogênese, secreção, síntese fosfolipídica e na degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático. Sendo assim a XBP1 ativa uma das principais vias relacionadas à função de empacotamento do RE e modulação do estresse do RE [50].

No sistema nervoso central estudos demonstraram o papel do estresse do retículo endoplasmático no déficit da regulação metabólica. Animais com insuficiência da XPB1, com níveis elevados de estresse do RE, demonstraram aumento no peso corporal [51]. Porém o tratamento com tauro-ursodeoxycholic ou ácido fenil-butírico, que são inibidores do estresse de RE, foi capaz de reduzir o peso corporal desses animais [52, 53].

Dessa forma, o **quinto objetivo do trabalho foi investigar a obesidade induzida por dieta altera a via inflamatória e induz estresse de RE em amígdala de ratos. Em adição, o sexto objetivo do trabalho foi investigar se a inibição do estresse do retículo endoplasmático, com PBA, reverte a resistência à insulina na amígdala de animais obesos.**

- 1) Investigar a expressão e grau de fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina (IR/PI3q/Akt), assim como a modulação da ingestão alimentar após estímulo com insulina na região da amígdala em animais controles.
- 2) Investigar se o bloqueio farmacológico da via da PI3K com (LY24002) na amígdala pode alterar a resposta à insulina quanto à ingestão alimentar e a sinalização de insulina intracelular em animais controles.
- 3) Investigar se a sinalização da insulina (IR/PI3q/Akt), pode modular a expressão de neuropeptídeos em condições fisiológicas.
- 4) Investigar a expressão e grau de fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina, assim como a modulação da ingestão alimentar após estímulo com insulina na região da amígdala em animais com obesidade induzida por dieta.
- 5) Se houver redução da ativação das proteínas da via de sinalização de insulina em amígdala de animais obesos: investigar a ativação e regulação das proteínas da via inflamatória e do stress do retículo endoplasmático em amígdala de animais obesos.
- 6) Investigar se a inibição do estresse do retículo endoplasmático com PBA reverte à resistência à insulina na amígdala de animais obesos.

3.1 Manuscript

Elsevier Editorial System (tm) for FEBS Open Bio

Article title: DIET-INDUCED OBESITY INDUCES ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

AND INSULIN RESISTANCE IN THE AMYGDALA OF RATS

Reference: FOB119

Journal title: FEBS Open Bio

Corresponding author: Prof. Patricia O. Prada

First author: Dr. Gisele Castro

Accepted manuscript (unedited version) available online: 11-SEP-2013

DOI information: 10.1016/j.fob.2013.09.002

DIET-INDUCED OBESITY INDUCES ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND INSULIN RESISTANCE IN AMYGDALA OF RATS

²Gisele Castro*, ¹Maria Fernanda C. Areias*, ¹Lais Weissmann, ¹Paula G. F. Quaresma, ¹Carlos K. Katashima, ¹Mario J.A. Saad, ^{1,2}Patricia O. Prada

* Authors contributed equally

¹Department of Internal Medicine and ²School of Applied Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Please address correspondence to: Patricia O. Prada, PhD., School of Applied Sciences, University of Campinas - UNICAMP - Rua Pedro Zaccaria, 1300 - Jd. Sta Luiza 13484-350, Limeira, SP, Brazil. Phone/Fax: +55 19 35218950, e-mail: pprada@fcm.unicamp.br

KEY WORDS: insulin, amygdala, Phosphatidylinositol 3-kinase, obesity, inflammation, endoplasmic reticulum stress, NPY, oxytocin.

ABSTRACT

Insulin acts in hypothalamus decreasing food intake (FI) by IR/PI3K/Akt pathway. This pathway is impaired in obese animals and endoplasmic reticulum (ER) stress and low grade inflammation are possible mechanisms involved in this impairment. Here, we highlighted amygdala as an important brain site of FI regulation in response to insulin. This regulation was dependent on PI3K/AKT pathway similar to the hypothalamus. Insulin was able to decrease NPY and increase oxytocin mRNA levels in the amygdala via PI3K, which may contribute to hypophagia. Additionally, obese rats did not reduce FI in response to insulin and AKT phosphorylation was decreased in the amygdala, suggesting insulin resistance. Insulin resistance was associated with ER stress and low grade inflammation in this brain region. The inhibition of ER stress with PBA reverses insulin action/signaling, decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels in the amygdala from obese rats, suggesting that ER stress is probably one of the mechanisms that induce insulin resistance in the amygdala.

HIGHLIGHTS

- Lower food intake in response to insulin in the amygdala is dependent on the PI3K/Akt pathway.
- Insulin decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels via PI3K *in vivo*.
- Insulin receptor and Akt phosphorylation in amygdala are disrupted in obese rats.
- Insulin resistance, ER stress and inflammation are present in amygdala of obese rats.
- The inhibition of ER stress with PBA reverses insulin resistance, decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels in the amygdala from obese rats.

1. Introduction

Insulin is an important peptide hormone that regulates the brain's control of food intake and energy expenditure [1-3]. Deletion of the insulin receptor (IR) in the central nervous system (CNS) of mice induced obesity and altered metabolism *in vivo* [3, 4]. Most studies consider the hypothalamus as the main region in the CNS which regulates energetic metabolism in response to insulin. However, insulin has effects in other brain regions, such as ventral tegmental area, substantia nigra, and amygdala [5-10].

In the hypothalamus, insulin acts through IR inducing insulin substrate 1 (IRS-1) tyrosine phosphorylation. IRS-1 tyrosine phosphorylation activates phosphoinositide 3-kinase (PI3K), which is required for the effects of insulin on feeding [11]. PI3K phosphorylates and generates phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate [3-5], which activates protein kinase B (PKB or Akt). The effect of IR/PI3K/Akt pathway on food intake is well described in the hypothalamic nuclei [1, 11]. In arcuate nucleus, insulin inhibits transcription of agouti-related peptide (AGRP) and neuropeptide Y (NPY), which are orexigenic neuropeptides [1]. On the other hand, hyperinsulinemia increases corticotrophin-releasing hormone (CRH) mRNA expression in the paraventricular nucleus of hypothalamus [12] which may contribute to induce hypophagia [13]. However, it has not been investigated if, in the amygdala, insulin may regulate IR/PI3K/Akt, and whether this pathway might modulate the expression of neuropeptides in physiologic conditions.

In obese animal models insulin-induced IR/PI3K/Akt pathway is impaired in the hypothalamus. Endoplasmic reticulum (ER) stress and low grade inflammation (LGI) are possible molecular mechanisms involved in this impairment. Both ER stress and LGI activate serine kinases such as c-Jun N-terminal kinase (JNK) and I kappa B kinase (IKK β) which induce inhibitory IRS-1 serine 307 phosphorylation triggering hypothalamic insulin resistance in obese states [1,14]. However, whether a high fat diet induces LGI and/or ER stress in amygdala is not known.

Thus, the aim of the present study was to investigate whether insulin activates IR/PI3K/Akt pathway in the amygdala and whether this activation controls feeding

and neuropeptides expression. In addition, we aimed to investigate whether a high fat diet induces ER stress and LGI in parallel to insulin resistance in amygdala.

2. Materials and Methods

2.1. Material

Eight week old male Wistar rats were obtained from Central Breeding Center of the State University of Campinas, São Paulo, Brazil. Human recombinant insulin was from Eli Lilly and Co. (Indianapolis, Indiana, USA). Routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless specified elsewhere. Antibodies against beta-actin (sc376421), phospho-IR (sc25103), phospho-JNK (sc55642), phospho-IKK α/β (sc21660) and phospho-PERK (sc32577) were from Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Phospho-IRE1^{ser724} (ab48187) was from Abcam (Massachusetts, USA). Phospho-Akt^{ser473} (9271S) was from Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA). FKBP51 (Q13451) was from Enzo Life Science (New York, USA).

2.2. Animal Characterization

All experiments were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas. Eight week old male Wistar rats were maintained in cycles of 12 h dark/light at 21 °C. Animals were randomly divided into two groups with similar body weights (BW) (280 $\pm$ 4g) according to the diet. Standard rodent chow (chow) (70% carbohydrate, 20% protein and 10% fat) and a high-fat diet (HFD) (55% saturated fat (lard), 29% carbohydrates and 16% protein) from Nuvilab (Sogorb Industria e Comércio Ltda, Brazil) were used for 2 months as previously described [14, 15]. Food and water were available *ad libitum*.

2.3. ITT (Insulin Tolerance Test)

Awakened fasted rats were submitted to insulin tolerance test. Briefly, 1.5 IU/kg of insulin was injected intraperitoneally and glycemia was measured at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min thereafter [15].

2.4. Food Intake Measurements

BW was measured 24h after insulin injection in amygdala. Food intake was recorded in a metabolic cage (Tecniplast 3701M081, Buguggiate, VA, Italy) for 4, 8, 12 and 24 h after insulin injection in amygdala.

2.5. Cannula implantation

Free fed rats were anesthetized with 1 mg/kg IP injections of a mixture of 70 mg/kg ketamine (Fort Dodge Animal Health, USA) and 2 mg/kg xylazine (Lloyd Laboratories, USA) and placed in a stereotaxic instrument (Ultra Precise - model 963 – Kopf). Briefly, rats were implanted with unilateral cannulas (26-gauge stainless-steel guide cannula (Plastics One, USA) aimed to the central nucleus of the amygdala (CeA): [coordinates (AP/L/DV to bregma) -2.16/-4.00/-7.18 mm] according to Paxinos and Watson and pilots experiments. Cannulas were fixed using two screws, special glue and acrylic cement. BW was monitored daily for 5-7 days following the surgery. We performed a pilot experiment to confirm the site of the cannulation. Briefly, rats received 2 μ l injection of methylene blue dye. Rats were killed immediately after the injection, and brains were collected on ice. Brains were sectioned 1 mm in a coronal stainless steel matrix with razor blades to check the position of the cannula and the site of injection under microscopy. To further confirm the dissections we re-blotted the membranes from immunoblotting experiments with an antibody against to co-chaperone FK506 binding protein 51 (FKBP51). This protein is expressed in the CeA and is not expressed in the striatum which is a close region to amygdala.

2.6. Insulin injections

After overnight fast cannulated rats received insulin (2 μ L) or saline (2 μ L) injections between 0700-0900h for tissues collections or food intake measurements. To inhibit PI3K we used LY-294002 (50 μ M from Calbiochem) or its vehicle (5% DMSO in saline) [16, 17].

2.7. Tissue Collection for Immunoblotting

Rats have been fasted for twelve hours and then received insulin or saline injection. After 15 min the amygdala was quickly dissected in a stainless-steel matrix with razor blades on ice [9, 10]. A pool of 5 rats per sample and four samples (n=4) per group was used. Samples were immediately homogenized in buffer (1% Triton X-100, 100mM Tris, pH 7.4, 100mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and 0.1 mg ml⁻¹ aprotinin at 4°C. The immunoblotting was performed as described before [14-17].

2.8. RNA isolation and Real Time-PCR

Rats have been fasted for twelve hours and received LY-294002 or vehicle injection into amygdala one hour prior of insulin or saline injections. Twelve hours later rats were killed by decapitation and fresh AMY was quickly collected on a stainless-steel matrix with razor blades on ice. Total RNA was isolated using RNeasy® Mini Kit (Cat. 74106, Qiagen Inc.CA,USA). Relative quantitative RT-PCR was performed using TaqMan RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) in an Mx3000P thermocycler (Stratagene). The Mx3000P software was used to calculate the cycle threshold for each reaction. Relative expression levels were determined using the comparative Ct method with normalization of target gene expression levels to *hypoxanthine phosphoribosyl transferase* (HPRT). Primers and probes sequences were purchased from Applied Biosystems and were: Oxytocin (Rn00564446-g1), neuropeptide Y (NPY) (Rn01410145_m1) and Crh (Rn01462137-m1), HPRT (Rn01527840_m1) for rat. The PCR conditions were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. Real time data were analyzed using the engine provided by Applied Biosystems.

2.9. 4-Phenyl Butyric Acid (PBA) Treatment

Rats fed a HFD were implanted with cannulas in amygdala as described before. After the recovery period (5-7 days), they were divided into two groups:

vehicle and PBA treated rats. Chemical chaperone PBA (1 μ g/kg of body weight) was dissolved in 4.6 mg/ml of DMSO into 1 mL of 0.9% saline and administered twice daily by gavage for 7 days as previously described [18, 19]. The vehicle group received the same amount of DMSO diluted in saline. Following the PBA or vehicle treatment, body weight, insulin action and signaling, ER stress, NPY and oxytocin mRNA levels were measured.

2.10. Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM of the number of independent experiments indicated. For statistical analysis, groups were compared using a two tailed t-test. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Food intake is decreased and IR and Akt phosphorylation are increased in response to insulin in the amygdala of rats on chow

Insulin injection in the amygdala did not alter 24h-body weight of rats fed with standard chow (Fig 1 A). To evaluate whether insulin in the amygdala affects food intake, we evaluated food intake 4, 8, 12 and 24 h after the hormone administration. Insulin injected in the amygdala did not decrease food ingestion after 4h. However, food intake was lower in response to insulin after 8, 12 and 24 h in rats on chow (Fig. 1 B). IR tyrosine phosphorylation and Akt serine phosphorylation were increased in response to insulin injected in the amygdala compared to saline injected rats (Fig. 1 C, D). In order to confirm whether the dissections of amygdala were corrected, we re-blotted the membranes with anti-co-chaperone FK506 binding protein 51 (FKBP51) antibody. We observed the presence of FKBP51 in our membranes, indicating that the dissections of amygdala were appropriate (Fig. 1 C). FKBP51 is expressed in the amygdala but not in striatum (Fig. 1 E).

3.2. Insulin decreases food intake and increases Akt phosphorylation in the amygdala via PI3K

Insulin plus LY or vehicle injections in the amygdala did not alter 24h-body weight of rats fed with standard chow (Fig 2 A). To evaluate whether insulin in the amygdala affects food intake is dependent of PI3K, we evaluated food intake 8 h after the hormone administration with prior LY or vehicle treatment. As expected, food intake was lower in response to insulin after 8 h in rats on chow. However, the administration of LY prior to insulin in the amygdala abolished this effect (Fig. 2 B). Akt serine phosphorylation was increased in response to insulin in the amygdala compared to saline injected rats. The administration of LY prior to insulin in the amygdala impaired Akt phosphorylation in response to insulin (Fig. 2 C). We observed the presence of FKBP51 in our membranes, indicating that the dissections of amygdala were appropriate (Fig. 2 C).

3.3. Insulin modulates NPY and oxytocin gene expression in amygdala

In order to gain insight regarding molecules regulated by insulin in the amygdala, we investigated whether insulin regulates neuropeptides expression in the amygdala from control rats. Insulin decreased NPY mRNA expression and increased oxytocin mRNA expression in the amygdala from chow group. LY injection blunted those effects (Fig. 3 A and B). CRH mRNA expression was not different between the groups (Fig. 3 C).

3.4. Insulin action and signaling in the amygdala are impaired in rats fed with HFD

Body weight was increased in rats fed with HFD compared to control rats (Fig. 4 A). Insulin tolerance test showed that obese rats were insulin resistant compared to control rats (Fig. 4 B). To evaluate whether HFD induces insulin resistance in the amygdala, we evaluated food intake 4, 8, 12 and 24 h in response to insulin or saline. Insulin injected in the amygdala did not decrease food intake after 4, 8, 12, 24 h in obese rats (Fig. 4 C). IR tyrosine phosphorylation and Akt serine phosphorylation were increased in response to insulin in the amygdala in control rats compared to saline injected rats. However, this effect was blunted in rats on HFD (Fig. 4 D, E). We observed the presence of FKBP51 in our

membranes, indicating that the dissections of amygdala were appropriate (Fig. 4 E).

3.5. HFD induces ER stress and low grade inflammation in amygdala

These results were obtained from rats without cannulas to reduce a possible interference of the surgery and chronic cannulas implantation on inflammatory and ER stress conditions. In order to evaluate ER stress, we investigated whether high fat feeding alters the phosphorylation of RNA-activated protein kinase-like ER resident kinase (PERK) and inositol-requiring kinase alpha (IRE1 α). PERK and IRE1 α phosphorylation were increased in the amygdala of rats fed a HFD compared to control rats, suggesting increased ER stress in the amygdala of obese rats (Fig. 5 A and B). JNK phosphorylation was increased in the amygdala of rats fed with a HFD compared to control animals (Fig. 5 C). IKK α /IKK β phosphorylation was also increased in the amygdala of obese rats (Fig. 5 D). We observed the presence of FKBP51 in our membranes, indicating that the dissections of amygdala were appropriate (Fig 5 A).

3.6. The inhibition of ER stress restores insulin action/signaling, decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels in amygdala from obese rats

We investigated whether the inhibition of ER stress with chemical chaperone PBA improves insulin resistance in the amygdala from rats fed a HFD. PBA treatment reduced PERK phosphorylation in the amygdala from obese rats, suggesting a reduction of ER stress in this brain region (Fig. 6 A). PBA treatment also reduced body weight of obese rats when compared with vehicle treated rats (Fig. 6 B). PBA treatment restored insulin action in the amygdala from obese rats since food intake was reduced after insulin injection into amygdala (Fig. 6 C). In parallel, we observed that Akt phosphorylation was increased in response to insulin in the amygdala from obese rats treated with PBA (Fig. 6 D). Insulin decreased NPY mRNA expression and increased oxytocin mRNA expression in the amygdala from obese rats treated with PBA compared to vehicle obese rats (Fig. 7 A and B).

These results suggest that the inhibition of ER stress reverses insulin resistance in the amygdala from obese animals. We observed the presence of FKBP51 in our membranes, indicating that the dissections of amygdala were appropriate (Fig. 6 D).

4. Discussion

Our data indicate that insulin signaling in amygdala may have an important role in the control of food intake, and this effect is mediated by PI3K pathway. Insulin also decreased NPY and increased oxytocin mRNA levels in amygdala from control rats. In addition, we showed that in high fat feeding rats there is an increase in inflammatory pathways and ER stress in the amygdala, and in parallel, insulin signaling is reduced in this brain region. The inhibition of ER stress reversed insulin resistance in amygdala.

The anorexigenic effects of insulin are well described in the hypothalamus. In the hypothalamus, insulin decreases food ingestion by signaling through IR/PI3K/Akt pathway [1, 17]. Insulin receptors have also been found to be abundant in the amygdala [7,8], more recently, amygdala was highlighted as an important site to regulate food intake.

Amygdala is involved in the control of emotion and cognitive functions as memory, learning, fear, anxiety, aversion and food preferences [20-24]. Inhibition of melanocortin into amygdala increased food intake. In contrast, injections of melanocortin agonist or enterostatin in the amygdala reduced food ingestion [10, 25-27].

Our data showed that insulin in the amygdala diminishes food intake in rats on chow. Similar result was obtained by Boghossian et al. (2009) [9]. However, in their study they did not investigate which pathway may account for the effect of insulin in amygdala [9, 10]. In our study we showed that LY injection abolished the anorexigenic effect of insulin, suggesting that the effect of insulin in the amygdala is mediated by PI3K/Akt pathway. In arcuate nucleus, the activation of neurons coexpressing agouti-related protein (AGRP), and NPY induces feeding [29, 30]. Here, we demonstrated that insulin decreased the orexigenic NPY mRNA

expression in amygdala via PI3K, which may contribute to decrease food intake. Oxytocin is an anorexigenic peptide and has been found to be abundant in the amygdala [31]. It was shown that insulin modulated oxytocin gene expression, at least, *in vitro* [32]. Indeed, we observed that insulin increased oxytocin mRNA expression via PI3K in amygdala *in vivo* of control rats. Together, these results suggest that the reduction on food intake in response to insulin was mediated, at least in part, by the decrease of NPY and increase of oxytocin mRNA levels.

It is well known that HF feeding induces insulin resistance in the CNS of rodents [28]. Indeed, we observed that insulin in the amygdala failed to reduce food intake in rats fed with HFD for 2 months. In parallel, we observed that Akt phosphorylation was faint in response to insulin in the amygdala of obese animals, suggesting insulin resistance in this region of CNS triggered by obesity.

Several mechanisms may contribute to the dysregulation of the insulin signaling pathway in the CNS of obese rodents [28, 33-35]. It is well known that obesity may induce ER stress in peripheral tissues and also in the hypothalamus [14, 35, 36]. Elevated caloric intake due to diets enriched in lipids such as saturated fatty acid and cholesterol elicits ER stress via alteration of calcium homeostasis and production of toxic metabolites [37-42].

Increased PERK and IRE1 α phosphorylation are indicators of ER stress. Diet-induced obesity and ob/ob mice have higher levels of PERK and IRE1 α phosphorylation in multiple tissues [36, 44]. Enhanced PERK and IRE1 α phosphorylation are also seen in the hypothalamus of obese mice [14, 35, 45]. In our study, we observed that PERK and IRE1 α phosphorylation were increased in the amygdala of rats on HFD, suggesting that in addition to the hypothalamus [1, 14] high fat feeding induces ER stress also in the amygdala. The inhibition of ER stress, with PBA treatment, reduced PERK phosphorylation in the amygdala in parallel to increase insulin action and signaling in this brain site. Furthermore, insulin was able to decrease NPY and increase oxytocin mRNA expression in the amygdala from obese rats treated chronically with PBA, suggesting a strong relationship between ER stress, insulin resistance and food intake controlled by

NPY and oxytocin levels. Together, these results suggest that ER stress induced by HFD is probably one of the mechanisms of insulin resistance in the amygdala.

ER stress and inflammatory pathways have many links [46-48]. IRE1 α induces JNK activation in many tissues which triggers a modulation of several inflammatory genes [49]. In addition, both IRE1 α and PERK activate IKK β /nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway driving inflammatory response [48].

The activation of JNK and IKK β induce inhibitory IRS-1 serine phosphorylation leading to insulin resistance in peripheral tissues and also in the hypothalamus [28, 49, 50]. Genetic disruption of IKK β in AgRP neurons protects mice from diet induced obesity [52]. Conditional deletion of JNK1 in the CNS of mice improved insulin signaling and action in the hypothalamus upon high fat diet [53, 54].

Our data demonstrated an increase in JNK and IKK β phosphorylation, in agreement with reduced Akt phosphorylation in response to insulin in the amygdala of obese rats, suggesting that these serine kinases may have important role downregulating insulin signaling in this brain region.

In summary, our results suggested that amygdala is an important region for food intake regulation in response to insulin and this regulation is disrupted in obese rats. We showed that food intake is regulated in a PI3K/Akt manner in the amygdala similarly to that occurs in the hypothalamus. Insulin also decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels via PI3K *in vivo*, which may contribute to hypophagia. Further, we provide data suggesting that obese rats may have low grade inflammation and ER stress in parallel to insulin resistance in the amygdala. The inhibition of ER stress with PBA improves insulin action and signaling in the amygdala from obese rats, suggesting that ER stress is probably one of the mechanisms of insulin resistance in the amygdala.

Acknowledgements

The present work received financial support of FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo): 2008/55674-8, Sao Paulo, Brazil and INCT (Instituto Nacional Ciência e Tecnologia em Obesidade e Diabetes): 573856/2008-7.

The authors would like to thank Dioze Guadagnini, Andrey dos Santos, Alexandre H. B. de Matos, Iscia Lopes-Cendes, L. Janeri, J. Pinheiro, (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo) for their technical assistance.

References

- [1] Belgardt, B.F., Bruning, J.C. (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 1212, 97-113.
- [2] Benoit, S.C., Clegg, D.J., Seeley, R.J., Woods, S.C. (2004). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res.* 59, 267-285.
- [3] Berthoud, H.R. (2007). Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake. *Physiol Behav.* 9, 486-498.
- [4] Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., Kahn, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 289, 2122-2125.
- [5] Elmquist, J.K. (1998). CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. *Lab Anim Sci.* 48, 630-637.
- [6] Figlewicz, D.P., Evans, S.B., Murphy, J., Hoen, M., Baskin, D.G. (2003). Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 964, 107-115.
- [7] Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., Brownstein, M. (1978). Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 5737-5741.
- [8] Havrankova, J., Roth, J., Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature.* 272, 827-829.
- [9] Boghossian, S., Lemmon, K., Park, M., York, D.A. (2009). High-fat diets induce a rapid loss of the insulin anorectic response in the amygdala. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297, R1302-1311.

- [10] Boghossian, S., Park, M., York, D.A. (2010). Melanocortin activity in the amygdala controls appetite for dietary fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298, R385-393.
- [11] Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R., Baskin, D.G., Myers, M.G., Jr., Seeley, R.J., Schwartz, M.W. (2003). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes.* 52, 227-231.
- [12] Chan, O., Inouye, K., Akirav, E., Park, E., Riddell, M.C., Vranic, M., Matthews, S.G. (2005). Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses. *Endocrinol.* 146, 1382–1390.
- [13] Hillebrand, J. J., de Wied, D., Adan, R. A. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides.* 23, 2283-2306.
- [14] Ropelle, E.R, Flores, M.B., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Pauli, J.R., Morari, J., de Souza, C.T., Moraes, J.C., Prada, P.O., Guadagnini, D., Marin, R.M., Oliveira, A.G., Augusto, T.M., Carvalho, H.F., Velloso, L.A., Saad, M.J., Carvalheira, J.B. (2010). IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* 24, 8(8).
- [15] Tsukumo, D.M., Carvalho-Filho, M.A., Carvalheira, J.B., Prada, P.O., Hirabara, S.M., Schenka, A.A., Araújo, E.P., Vassallo, J., Curi, R., Velloso, L.A., Saad, M.J. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 56, 1986-1998.
- [16] Prada, P.O., Ropelle, E.R., Mourão, R.H., de Souza, C.T., Pauli, J.R., Cintra, D.E., Schenka, A., Rocco, S.A., Rittner, R., Franchini, K.G., Vassallo, J., Velloso, L.A., Carvalheira JB, Saad MJ.(2009). EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice. *Diabetes.* 58, 2910-2919.
- [17] De Souza, C.T., Frederico, M.J., da Luz, G., Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Pauli, J.R., and Velloso, L.A. (2010). Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol.* 588, 2239-2253.

- [18] Ozcan, L., et al. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 9, 35–51.
- [19] Won, J.C., Jang, P.G., Namkoong, C., Koh, E.H., Kim, S.K., Park, J.Y., Lee, K.U., Kim, M.S. (2009). Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity* (Silver Spring). 17, 1861–1865
- [20] Figlewicz, D.P., MacDonald Naleid, A., Sipols, A.J. (2007). Modulation of food reward by adiposity signals. *Physiol Behav.* 91, 473-478.
- [21] Glass, M.J., Billington, C.J., Levine, A.S. (2000). Naltrexone administered to central nucleus of amygdala or PVN: neural dissociation of diet and energy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279, R86-92.
- [22] Glass, M.J., Billington, C.J., Levine, A.S. (1999). Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides.* 33, 360-368.
- [23] Kelley, A.E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev.* 27, 765-776.
- [24] Yamamoto, T. (2007). Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem Senses.* 32, 105-109.
- [25] Primeaux, S.D., York, D.A., Bray, G.A. (2006). Neuropeptide Y administration into the amygdala alters high fat food intake. *Peptides.* 27,1644-1651.
- [26] Lin, L., Park, M., Hulver, M., York, D.A. (2006). Different metabolic responses to central and peripheral injection of enterostatin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290, R909-915.
- [27] Lin, L., Park, M., York, D.A. (2007). Enterostatin inhibition of dietary fat intake is modulated through the melanocortin system. *Peptides.* 28, 643-649.
- [28] Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., Torsoni, M.A., Ueno, M., Hirata, A.E., Corezola do Amaral, M.E., Hoer, N.F., Boschero, A.C., Saad, M.J. (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 146, 1576-1587.

- [29] Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., Barsh, G.S., Horvath, T.L., Brüning, J.C. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci.* 8, 1289–1291.
- [30] Luquet, S., Perez F.A., Hnasko T.S., Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*. 310, 683–685.
- [31] Chaves, V.E., Tilelli C.Q., Brito N.A., Brito M.N. (2013). Role of oxytocin in energy metabolism. *Peptides*. 45, 9-14.
- [32] Lioutas, C., Einspanier, A., Kascheike, B., Walther, N., Ivell, R. (1997). An autocrine progesterone positive feedback loop mediates oxytocin upregulation in bovine granulosa cells during luteinization. *Endocrinology*. 138, 5059–5062.
- [33] Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Migrenne, S., Lefevre, A.L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest*. 119, 2577-2589.
- [34] Park-York, M., Boghossian, S., Oh, H., York, D.A. (2012). PKC theta Expression in the Amygdala Regulates Insulin Signaling, Food Intake and Body Weight. *Obesity (Silver Spring)*. 21(4), 755-64.
- [35] Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G., Jr., Ozcan, U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab*. 9, 35-51.
- [36] Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 306, 457-461.
- [37] Listenberger, L.L., Ory, D.S., Schaffer, J.E. (2001) Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem*. 276, 14890– 14895.
- [38] Holland, W.L., Brozinick, J.T, Wang, L.P, Hawkins, E.D, Sargent, KM. (2007)

Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 5, 167–179.

[39] Unger, R.H.; Orci, L. (2002). Lipoapoptosis: Its mechanism and its diseases. *Biochim. Biophys Acta.* 1585, 202–212.

[40] Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T., Arai, H. (2010). Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem.* 285, 22027–22035

[41] Samuel, V.T., Petersen, K.F., Shulman, G.I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet.* 375, 2267-2277

[42] Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L. (2011). Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* 473, 528–531.

[43] Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 140, 900-917.

[44] Tsutsumi, A., Motoshima, H., Kondo, T., Kawasaki, S., Matsumura, T., Hanatani, S., Igata, M., Ishii, N., Kinoshita, H., Kawashima, J. (2011). Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 404, 339-344.

[45] Won, J.C., Jang, P.G., Namkoong, C., Koh, E.H., Kim, S.K., Park, J.Y., Lee, K.U., Kim, M.S. (2009). Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring).* 17, 1861-1865.

[46] Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P., Ron, D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* 24, 10161-10168.

[47] Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J., Exton, J.H. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol.* 26, 3071-3084.

- [48] Hummasti, S., Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res.* 107, 579-591.
- [49] Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 287, 664-666.
- [50] Lee, Y.H., Giraud, J., Davis, R.J., White, M.F. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem.* 278, 2896-2902.
- [51] Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee Y.H., Shoelson, S.E., White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem.* 277, 1531-1537.
- [52] Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., Cai, D. (2008). Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 135, 61-73.
- [53] Belgardt, B.F., Mauer, J., Wunderlich, F.T., Ernst, M.B., Pal, M., Spohn, G., Bronneke, H.S., Brodesser, S., Hampel, B., Schauss, A.C. (2010). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 6028-6033.
- [54] Unger, E.K., Piper, M.L., Olofsson, L.E., Xu, A.W. (2010). Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. *Endocrinology.* 151, 671-682.

Figure Legends

Fig. 1. Food intake and insulin signaling in amygdala from rats on chow. (A) body weight (BW) after insulin injections; (B) food intake in g/g of BW in response to insulin (2 μ L) injected in amygdala; (C) insulin receptor (IR) and (D) protein kinase B (PKB or Akt) phosphorylation in response to insulin; (E) protein expression of co-chaperone FK506 binding protein 51 (FKBP51) in amygdala (AMY) and striatum (STR). Data are means $\pm$ SD from 10 rats per group. To performed immunoblotting (IB) of amygdala (C and D) We used a pool of 5 rats per sample and four samples (n=4) per group. We used β -actin as a loading control. FKBP51

was blot to confirm AMY dissections. Two tailed T Test was used. * $P < 0.05$ versus saline injected rat.

Fig. 2. *Insulin decreases food intake via PI3K in the amygdala.* (A) body weight (BW) after insulin (2 μ g), and LY (294002 -50 μ M) injections; (B) food intake in g/g of BW in response to insulin (2 μ g) or saline with prior injection of LY or vehicle (5% DMSO in saline) in amygdala; (C) protein kinase B (PKB or Akt) phosphorylation in response to insulin with prior injection of LY or vehicle in amygdala. Data are presented as means $\pm$ SD from 10 rats per group. To performed immunoblotting (IB) of amygdala (C) we used a pool of 5 rats per sample and four samples (n=4) per group. We used β -actin as a loading control. FKBP51 was blot to confirm AMY dissections. Two tailed T Test was used. * $P < 0.05$ versus other groups; # $P < 0.05$ versus saline injected rats. Veh: vehicle.

Fig 3. *Insulin modulates NPY and oxytocin expression in amygdala.* Fasted control rats were injected with insulin (2 μ g) or saline with prior injection of LY or vehicle (5% DMSO in saline) in amygdala. (A) neuropeptide Y (NPY); (B) oxytocin and (C) corticotropin-releasing hormone (CRH) mRNA levels in amygdala. To perform RT-PCR of amygdala we used a pool of 5 rats per sample and 4 samples per group (n=4). One-Way ANOVA was used. * $P < 0.05$ versus other groups. Veh: vehicle.

Fig. 4. *High fat diet (HFD) impairs insulin action and signaling in amygdala.* (A) body weight (BW) of rats on chow or HFD; (B) blood glucose during insulin tolerance test (ITT) of awake rats on chow or HFD; (C) food intake in g/g of BW in response to insulin (2 μ g) injected in amygdala of HFD animals; (D) insulin receptor (IR) and (E) protein kinase B (PKB or Akt) phosphorylation in response to insulin (2 μ g) of rats on chow or HFD. Data are presented as means $\pm$ SD from 10 rats. To performed immunoblotting (IB) of amygdala (d and e) We used a pool of 5 rats per sample and four samples (n=4) per group. We used β -actin as a loading control. FKBP51 was blot to confirm AMY dissections. Two tailed T Test was used. * $P < 0.05$ versus chow; # $P < 0.05$ versus other groups.

Fig. 5. HFD induces ER stress and low grade inflammation in amygdala. (A) PERK and (B) IRE1 α phosphorylation in amygdala from rats on chow or HFD. (C) JNK and (D) IKK α/β phosphorylation in amygdala from rats on chow or HFD. Data are presented as means $\pm$ SD. To performed immunoblotting (IB) of amygdala we used a pool of 5 non-cannulated rats per sample and three samples per group. FKBP51 was blot to confirm AMY dissections. Two tailed T Test was used. *P<0.05 versus chow.

Fig 6. The inhibition of ER stress improves insulin resistance in amygdala from obese animals. (A) PERK phosphorylation in the amygdala from rats on HFD treated with 4-phenylbutyric acid (PBA) or vehicle (DMSO in saline); (B) body weight during PBA treatment; (C) 8 h-food intake (g/g of Body Weight (BW)); (D) Akt phosphorylation in response to insulin (2 μ g) or saline injected in the amygdala from rats on a HFD treated with PBA or vehicle. Data are presented as means $\pm$ SD from 10 rats per group. To performed immunoblotting (IB) of amygdala we used a pool of 5 rats per sample and four samples (n=4) per group. We used β -actin as a loading control. FKBP51 was blot to confirm AMY dissections. Two tailed T Test and Two-Way ANOVA were used. *P<0.05 versus other groups. Veh: vehicle.

Fig 7. The inhibition of ER stress decreases NPY and increases oxytocin mRNA levels in amygdala from obese rats. Rats on high fat diet (HFD) were treated with PBA or vehicle (VEH) (5% DMSO in saline) for 7 days to investigate neuropeptides expression in the amygdala. 24h-fasted HFD rats were injected with insulin (2 μ g) in amygdala. (A) neuropeptide Y (NPY) and (B) oxytocin mRNA levels in response to insulin in amygdala from rats treated with PBA or VEH. To perform RT-PCR of amygdala we used a pool of 5 rats per sample and 4 samples per group (n=4). T test was used to analyze the differences between groups. * P<0.05 versus vehicle.

Figure 1.

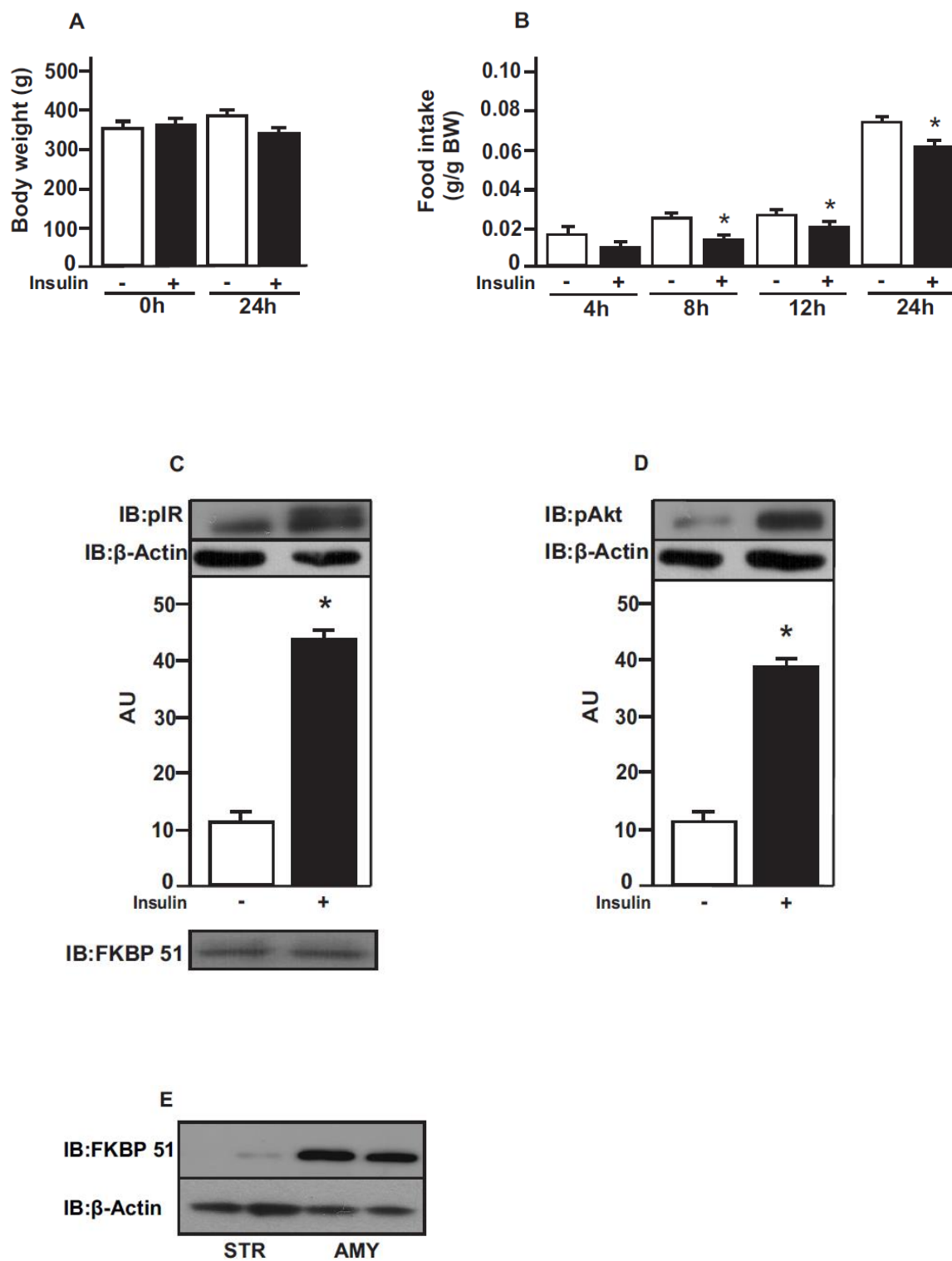


Figure 2.

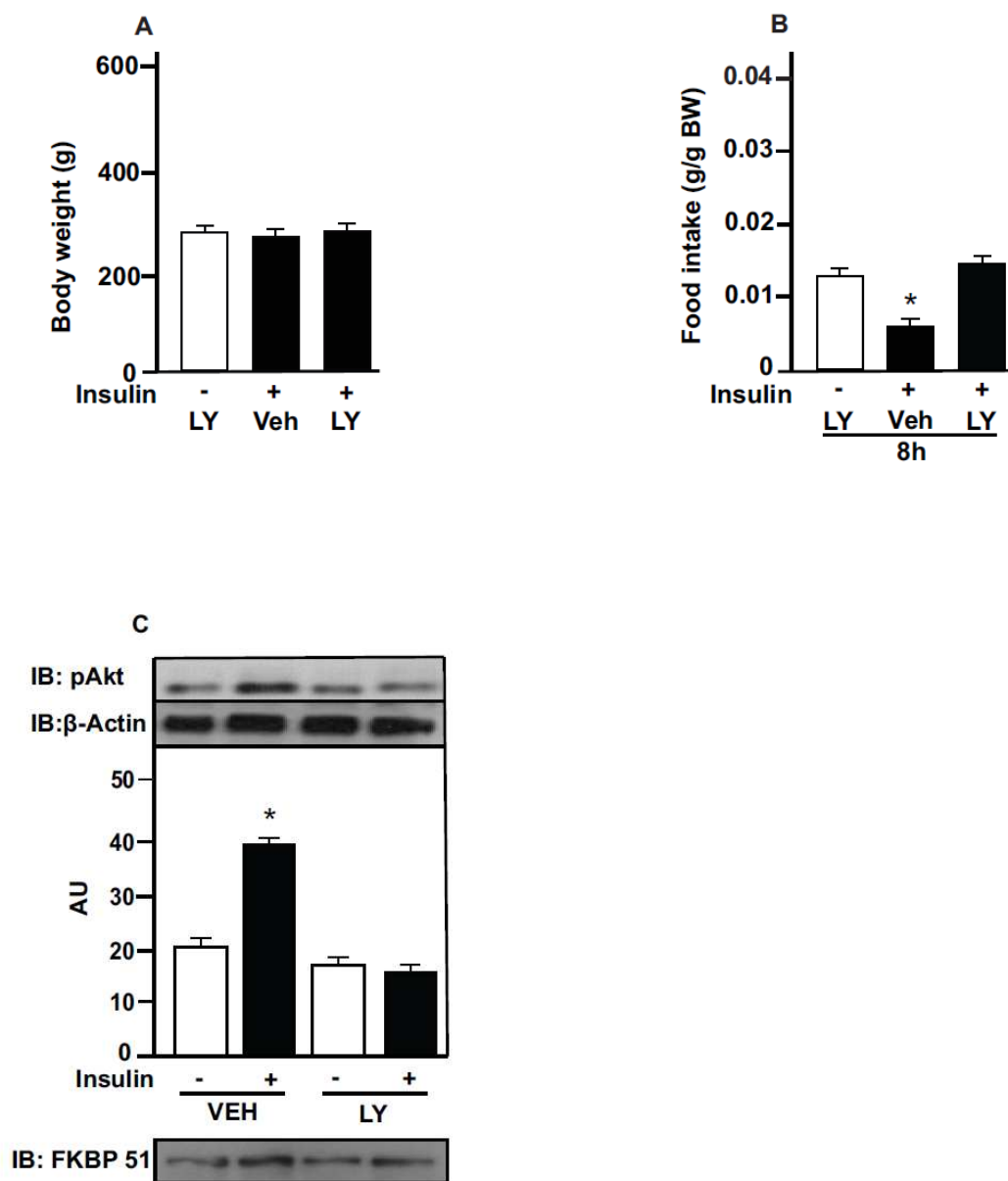


Figure 3.

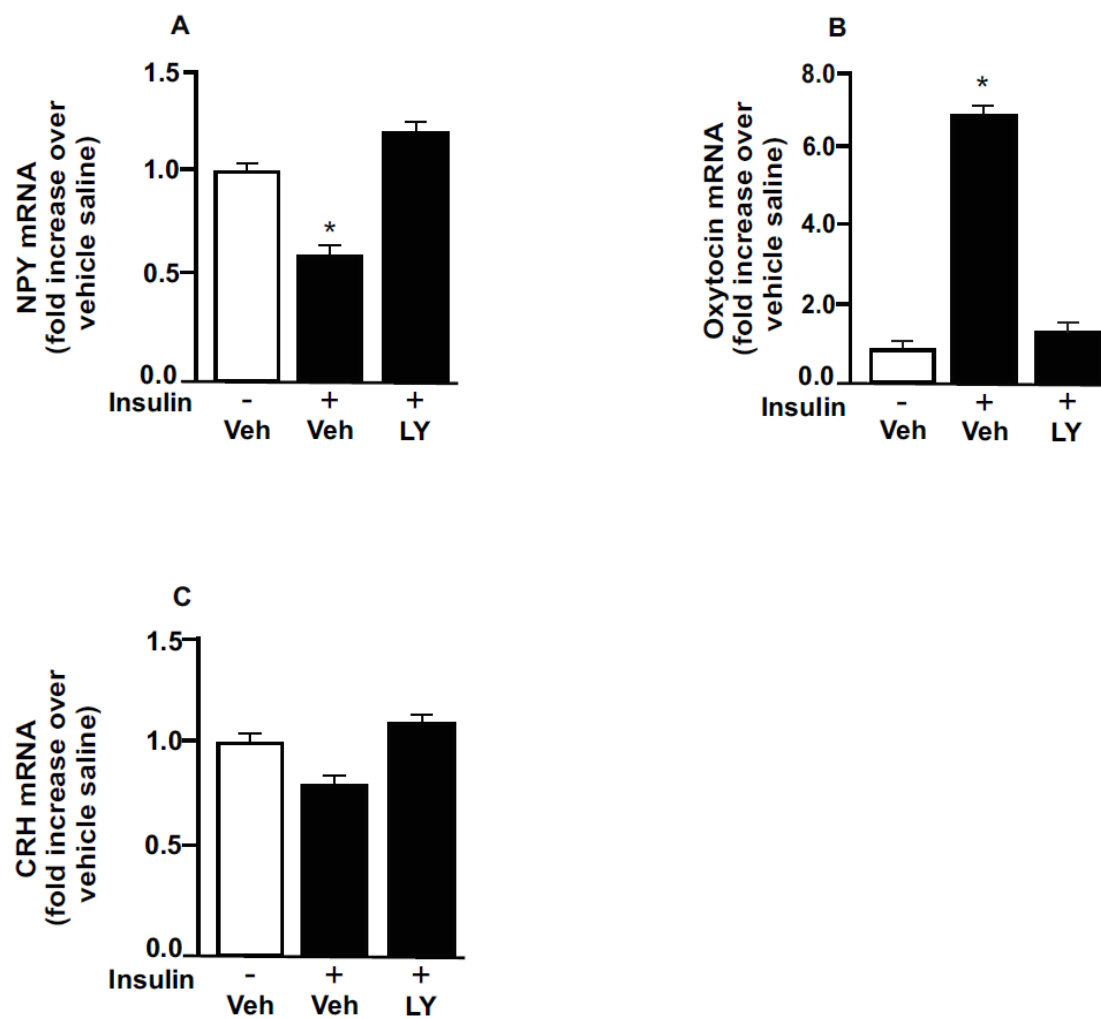


Figure 4.

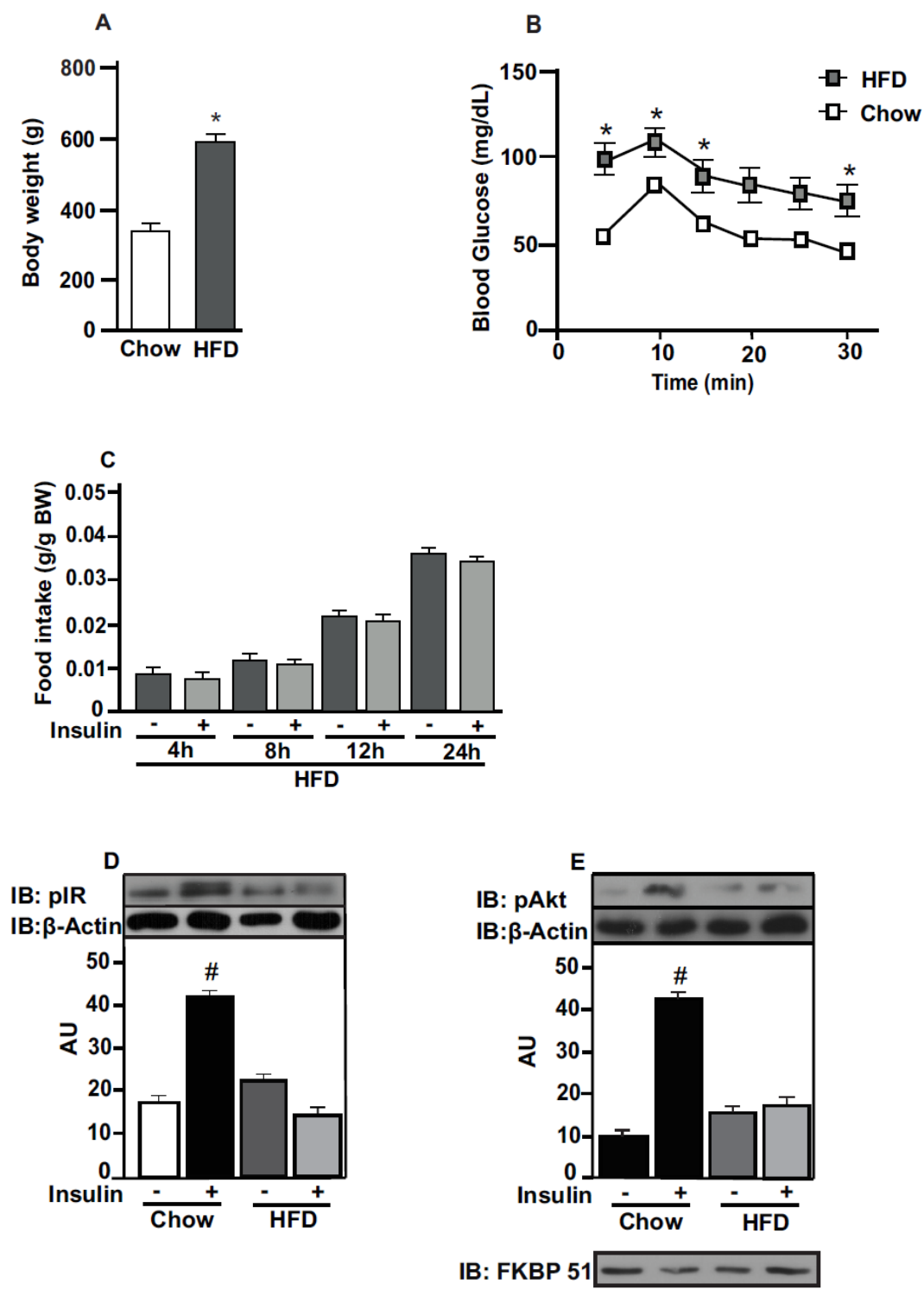


Figure 5.

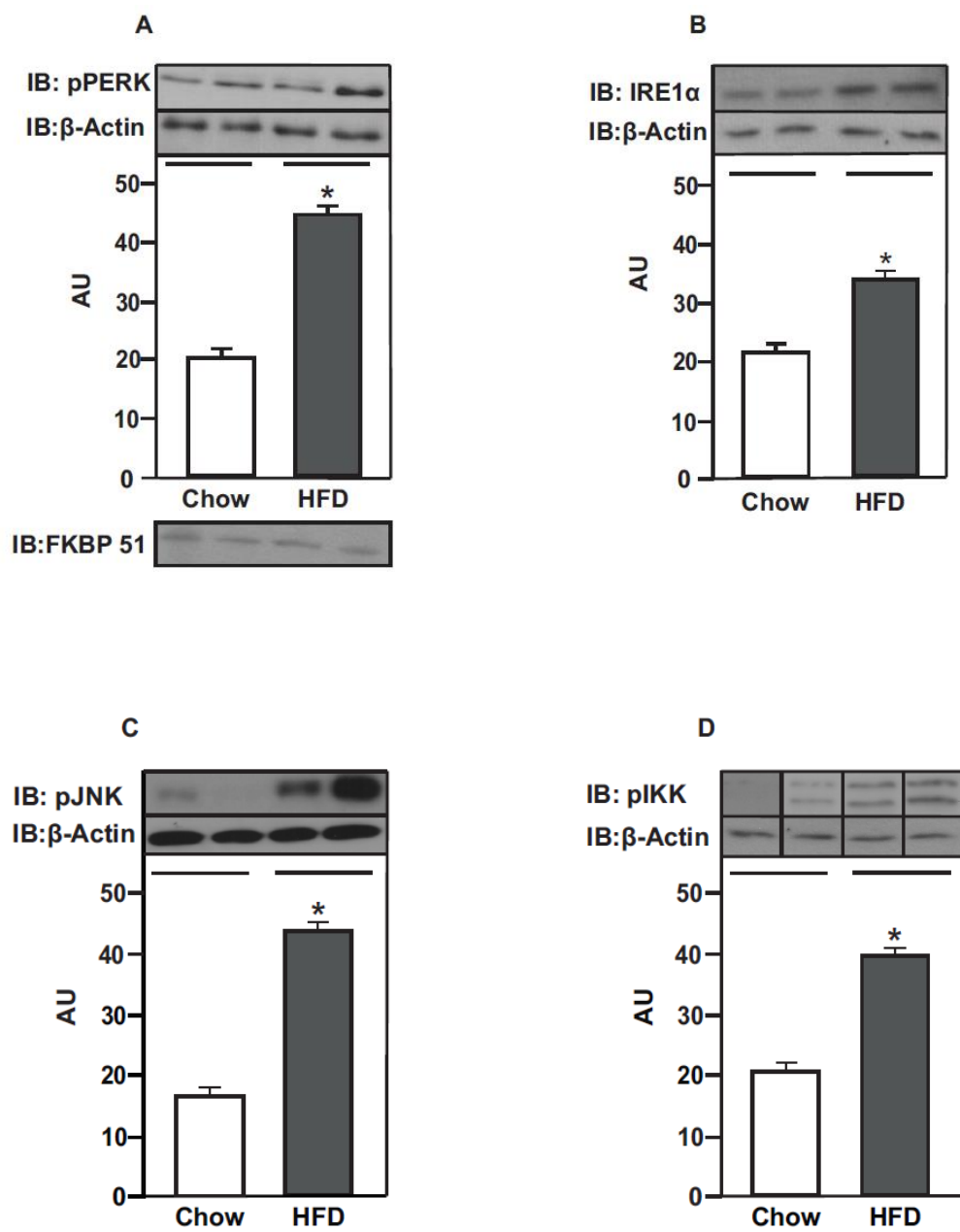


Figure 6.

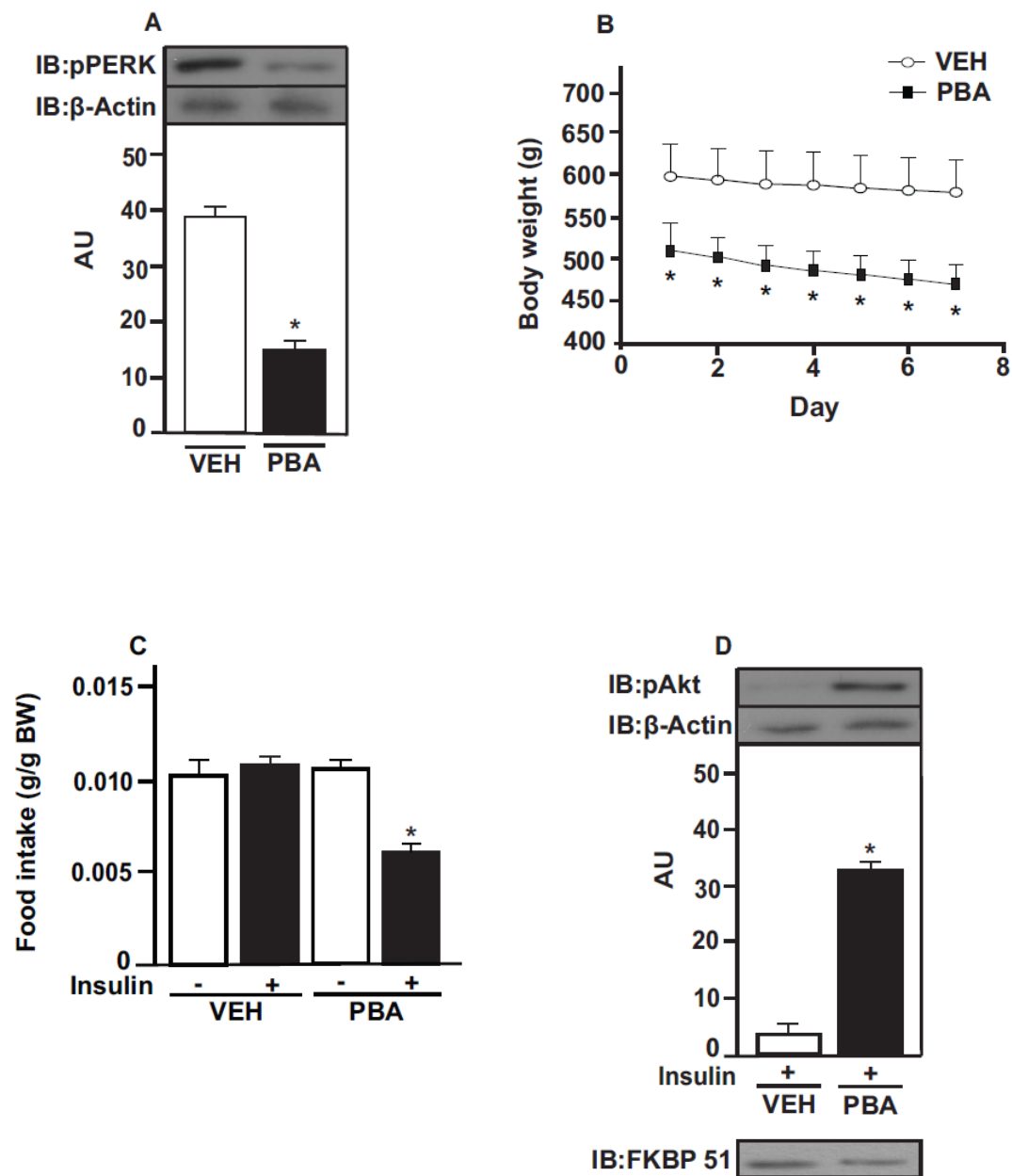
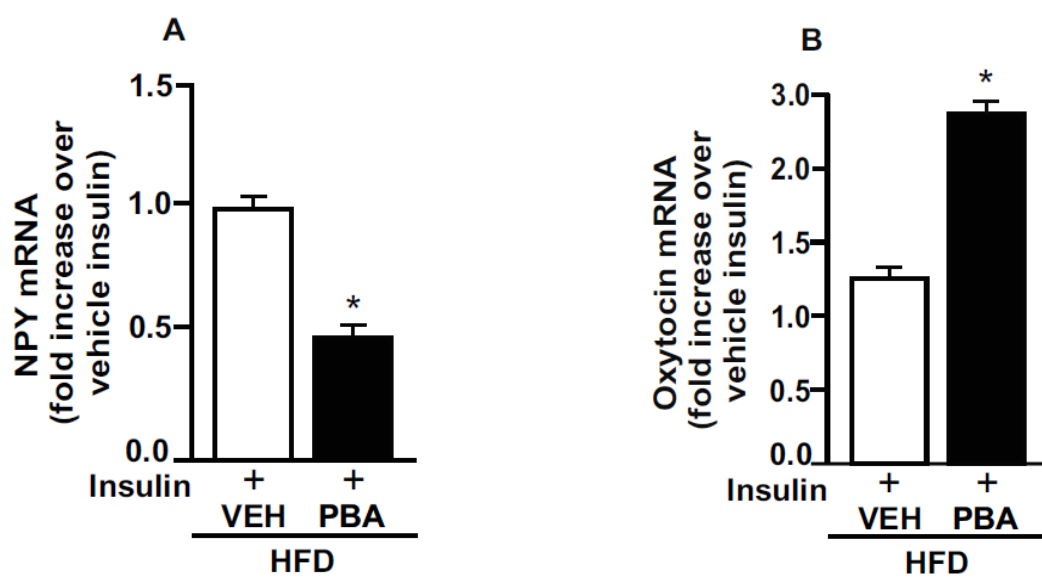


Figure 7.



O presente estudo demonstrou que a injeção de insulina na região central da amígdala reduz a ingestão alimentar de ratos controles via PI3q/Akt, de forma similar ao que ocorre no hipotálamo. A insulina também reduziu a expressão do RNAm de NPY e aumentou a expressão do RNAm de ocitocina via PI3q, *in vivo*. Boghossian et al, (2009) observaram redução de ingestão alimentar após injeção de insulina na região central da amígdala em ratos Sprague Dawley. Entretanto, estes autores não investigaram a via molecular que estava envolvida neste efeito como também não investigaram que neuropeptídeos estavam envolvidos na resposta à insulina. A redução da expressão de NPY na amígdala, via PI3q, sugere que a insulina regula a expressão deste neuropeptídeo na amígdala, assim como ocorre em hipotálamo. Esta redução pode ter contribuído com a diminuição da ingestão em resposta à insulina observada neste grupo de animais.

No núcleo-arqueado, a ativação de neurônios que expressam AGRP e NPY induz a ingestão alimentar ^[54, 55]. Na amígdala, sabe-se que o NPY tem uma forte relação com o aumento da ingestão alimentar ^[56]. A infusão de NPY na amígdala foi capaz de aumentar a preferencia do animal pela dieta com alto teor calórico ^[57].

Outro peptídeo encontrado em abundância na região da amígdala é a ocitocina ^[58]. Este possui vários efeitos fisiológicos, incluindo o efeito anorexigênico ^[59]. A insulina aumenta a expressão gênica da ocitocina *in vitro* ^[60]. De fato, nosso estudo demonstrou que a insulina aumenta a expressão do RNA mensageiro da ocitocina via PI3K na amígdala de ratos controles.

Em conjunto, a redução de RNAm de NPY e o aumento do RNAm da ocitocina em amígdala, podem ter contribuído para a redução da ingestão alimentar em resposta à insulina.

No presente estudo, observou-se uma redução da ativação do receptor de insulina e da Akt na região central da amígdala que foi acompanhada pela resistência à ação da insulina em animais que receberam dieta hiperlipídica por 2 meses. Boghossian et al, (2009) observaram que ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 3 dias não reduziam a ingestão após injeção de insulina na amígdala, confirmando assim os resultados do presente estudo. O que esse artigo não mostrou foi se esta resistência à ação da insulina era decorrente da redução da fosforilação de proteínas da via da insulina. Este mesmo

grupo de pesquisadores, posteriormente demonstrou que a dieta hiperlipídica foi associada com o aumento dos níveis PKC θ na região da amígdala de ratos Sprague Dawley. A injeção de lentivírus para superexpressar PKC θ na amígdala foi acompanhada pela diminuição aguda do efeito anorexigênico da insulina em animais controles. Como a PKC θ é uma serina quinase, os autores sugeriram que seu aumento poderia ser um mecanismo indutor de resistência à insulina [48]. Ainda neste artigo, demonstraram que a superexpressão de PKC θ na amígdala, cronicamente, só aumentou a ingestão alimentar e ganho de peso quando os animais foram submetidos à dieta hiperlipídica. Assim, suscitou a dúvida se o efeito foi decorrente da superexpressão de PKC θ ou se foi outro efeito decorrente da dieta hiperlipídica [48]. Também não foi realizada a inibição da PKC θ no intuito de avaliar a reversão da resistência à insulina.

Dietas enriquecidas com lipídios, como ácidos graxos saturados e colesterol provocam o estresse do RE. Recentemente, muitos estudos demonstram mecanismos através dos quais o excesso de lipídio induz o estresse do RE [62, 63, 64, 65]. Exposição ao ácido graxo saturado palmitato (16:00) induz o estresse do RE, pois o palmitato bloqueia a síntese de triglicerídeos e sua secreção em forma de triglicérides. Assim gera um acúmulo de lípidos e citotoxicidade pelo aumento de espécies reativas de oxigênio [66], ceramidas [67, 68], fosfolipídios altamente saturados na membrana do retículo endoplasmático [69] e diacilgliceróis [63]. Excesso de colesterol também induz o estresse do RE por inibir a atividade da *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA), afetando a homeostase do cálcio e provocando o estresse do RE [62].

Sabe-se que a obesidade está associada com o estresse do RE, sendo este desencadeado pela ativação de uma resposta adaptativa conhecida como UPR [50]. Entre as condições que provocam o estresse do RE na obesidade estão privação de glicose e nutrientes, infecções virais, lípidos, aumento da síntese e secreção de proteínas e expressão de proteínas mutantes ou não dobradas [40, 30, 32]. Em um estudo animais geneticamente obesos apresentaram estresse de RE em fígado e tecido adiposo [47]. Won, et al, (2009), demonstraram que a administração intracerebroventricular (ICV) do indutor de estresse do RE tasisigardina (TG) aumentou a ingestão alimentar e o peso corporal dos animais obesos, além disso a administração ICV de TG inibiu o efeito anorexigênico da insulina e leptina [71].

Nossos resultados sugerem que ratos obesos apresentam inflamação subclínica e estresse de RE associados à resistência à insulina em amígdala semelhante ao que ocorre em hipotálamo. A inibição do estresse de RE, com PBA, melhorou a ação e sinalização de insulina nesta região do SNC. Além disso, a insulina foi capaz de diminuir a expressão do RNAm do NPY e aumentar a expressão do RNAm da ocitocina na amígdala de ratos obesos tratados com PBA, sugerindo uma forte relação entre o estresse do RE, resistência à insulina e ingestão alimentar controlada pelos níveis de NPY e ocitocina. Os resultados mostram o estresse do RE como um possível mecanismo de resistência à insulina em amígdala.

A associação entre estresse de RE e inflamação subclínica ocorre, pois ambas aumentam a ativação das serinas quinases JNK e IKK que inibem o sinal da insulina. No estresse de RE, as proteínas IRE1 e PERK são responsáveis por esta ativação. Na inflamação subclínica dos obesos a ativação de receptores do sistema imune inato, como o Toll like receptor 4, além de citocinas no SNC, produzidas por células gliais, podem ativar a JNK e IKK [77,46, 78]. No presente estudo observou-se um aumento da ativação da proteína IRE1 e PERK na amígdala de animais obesos, sugerindo que a dieta hiperlipídica induziu o estresse de retículo nesta região do sistema nervoso central. Pode-se também especular que o aumento da fosforilação da JNK e IKK pode ter sido induzido pelo aumento da fosforilação da IRE1 e PERK e também pela inflamação subclínica do obeso.

Em conjunto, os resultados sugerem que a amígdala é sensível a ação anorexigênica da insulina, sendo este efeito dependente da via PI3q. Este efeito reduz NPY e aumenta ocitocina, favorecendo a hipofagia. Animais obesos apresentam resistência à ação anorexigênica da insulina em amígdala acompanhada pela redução da ativação do receptor de insulina e da Akt. O mecanismo molecular pelo qual ocorre resistência à insulina parece estar relacionado à ativação da via inflamatória e ao estresse de retículo endoplasmático. A inibição do estresse de RE melhorou a ação e sinalização de insulina na região da amígdala, sugerindo que este mecanismo é essencial para a indução de resistência à insulina nesta região do sistema nervoso central.

1. A ação da insulina na amígdala reduz a ingestão alimentar de animais controles.
2. O efeito anorexigênico da insulina na amígdala é via IR/PI3q/Akt.
3. Os animais obesos apresentam resistência à ação anorexigênica da insulina.
4. A insulina diminui a expressão do RNAm do NPY e aumentou a expressão do RNAm da ocitocina na amígdala via PI3q.
5. A resistência à insulina na amígdala de obesos é associada à redução da ativação da via IR/Akt nesta região.
6. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a ativação, em amígdala, de serinas quinases como JNK e IKK que participam da via inflamatória, o que pode justificar a resistência à insulina.
8. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica induz o estresse de retículo endoplasmático em amígdala, podendo ser mais um elemento indutor de resistência à insulina nesta região do sistema nervoso central.
9. A inibição do estresse de RE pelo tratamento com PBA melhora a ação e sinalização de insulina, diminuindo a expressão do RNAm do NPY e aumentando a expressão do RNAm da ocitocina na amígdala de animais obesos.

Nossos resultados sugerem a amígdala como uma região importante na regulação da ingestão alimentar sendo esse controle realizado, em parte, pela ação da insulina através da via PI3K. A redução na ingestão alimentar em resposta à insulina observada é mediada, pelo menos em parte, pela diminuição na expressão do RNAm do NPY e aumento na expressão do RNAm da ocitocina. Os animais obesos apresentam uma resistência à insulina na região da amígdala. O mecanismo pelo qual ocorre esta resistência está associado à indução de estresse do retículo endoplasmático e inflamação subclínica. A inibição do estresse de RE melhora a ação e sinalização de insulina, fortalecendo a hipótese de que o estresse do retículo endoplasmático é um mecanismo importante para desencadear resistência à insulina na amígdala.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ahima, RS. Digging deeper into obesity. *The journal of Clinical Investigation*. 2011 Jun;121(6):2076-79.
- [2] Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: na affective neuroethological perspective. *Brain Res Rev*. 2007 Dec;56(2):283–321.
- [3] Ariyama, H, Kono, N, Matsuda, S, Inoue, T, Arai, H. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2010 Dec;285:22027–22035.
- [4] Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*. 2005 Nov;123:493–505.
- [5] Balthasar N. Genetic dissection of neuronal pathways controlling energy homeostasis. *Obesity*. 2006 Aug;14 Suppl 5:222S–227S.
- [6] Basseri S, Lhotak S, Sharma AM, Austin RC. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. *J. Lipid Res*. 2009 Dec;50:2486–2501.
- [7] Belgardt, BF; Husch, A; Rother, E; Ernst, MB; Wunderlich, FT; Hampel, B; Klöckener, T; Alessi, D; Kloppenburg, P; Brüning, JC. PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab*. 2008 Apr; 7(4):291-301.
- [8] Boghossian S, Lemmon K, Park M, York DA. High-fat diets induce a rapid loss of the insulin anorectic response in the amygdala. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Nov;297: 302-311.
- [9] Bruning, JC; Gautam, D; Burks, DJ; Schubert, M; Orban, PC; Klein, R; Krone, W; Muller-Wieland, D; Kand, CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000 Sep;289(5487):2122-5.

- [10] Chan, O; Inouye, K; Akirav, E; Park, E; Riddell, MC; Vranic, M; Matthews, SG. Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses. *Endocrinol.* 2005 Mar;146:1382–1390.
- [11] Chaves, VE, Tilelli CQ, Brito NA, Brito MN. Role of oxytocin in energy metabolism. *Peptides.* 2013 Jul;45:9-14.
- [12] De Souza CT; Araujo EP; Bordin S; Ashimine R; Zollner RL; Boschero AC; Saad MJ; Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005 Oct;146:4192–4199.
- [13] Daws LC; Avison MJ; Robertson SD; Niswender KD; Galli A; Saunders C. Insulin signaling and addiction. *Neuropharmacology.* 2011 Dec;61:1123–1128.
- Eizirik, DL; Cardozo, AK; Cnop, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008 Feb;29(1):42-61.
- [14] Farooqi, IS; Bullmore, E; Keogh, J; Gillard, J; O`Rahilly, S; Fletcher, PC. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science.* 2007 Sep;317-1355.
- [15] Figlewicz, DP; Bennett, J; Evans, SB; Kaiyala, K; Sipols, AJ; Benoit SC. Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. *Behavioral neuroscience.* 2004 Jun;118:479–487.
- [16] Figlewicz DP, Naleid AM, Sipols AJ. Modulation of food reward by adiposity signals. *Physiol Behav.* 2007 Aug; 91: 473–478.
- [17] Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* 2011 May;473:528–531.
- [18] Fletcher PC, Napolitano A, Skeggs A, Miller SR, Delafont B, Cambridge VC de Wit S, Nathan PJ, Brooke A, O`Rahilly S, Farooqi IS, Bullmore ET. Distinct modulatory effects of satiety and sibutramine on brain responses to food images in humans: a double dissociation across hypothalamus, amygdala, and ventral striatum. *J Neurosci.* 2010 Oct;30(43):14346-55.

- [19] Fu, S, Yang, L, Li, P, Hofmann, O, Dicker, L. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*. 2011 May;73:528–531.
- [20] Gilpin NW. Neuropeptides in Central Amygdala: Role in Anxiety- and Alcohol-Related Behaviors. *Alcohol*. 2012 Jun;46(4):329–337.
- [21] Glass MJ, Billington CJ, Levine AS. Naltrexone administered to central nucleus of amygdala or PVN: neural dissociation of diet and energy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Jun;279:R86–R92.
- [22] Gropp, E, Shanabrough, M, Borok, E, Xu, AW, Janoschek, R, Buch, T, Plum, L, Balthasar, N, Hampel, B, Waisman, A, Barsh, G.S, Horvath, TL, Brüning, JC. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci*. 2005 Oct;8:1289–1291.
- [23] Hajnal A, Pothos EN, Lénárd L, Hoebel BG. Effects of feeding and insulin on extracellular acetylcholine in the amygdala of freely moving rats. *Brain Res*. 1998 Feb;785(1):41-8.
- [24] Hillebrand, JJ; de Wied, D; Adan, RA. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*. 2002 Dec;23:2283-2306.
- [25] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov;420:333-6.
- [26] Holland, WL, Brozinick, JT, Wang, LP, Hawkins, ED, Sargent, KM. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2007 Mar;5:167–179.
- [27] Holsen LM, Zarcone JR, Brooks WM, Butler MG, Thompson TI, Ahluwalia JS, Nollen NL, Savage CR. Neural mechanisms underlying hyperphagia in Prader-Willi syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Jun;14(6):1028-37.
- [28] Hotamisligil, GS. Inflammatory pathways and insulin action. *J Obes Relat Metab Disord*. 2006 Dec;(3):53-5.
- [29] Hotamisligil, GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):396-9.

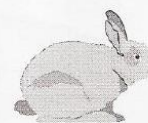
- [30] Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jun;3:411–421.
- [31] King BM, Sam H, Arceneaux ER, Kass JM. Effect on food intake and body weight of lesion in and adjacent to posterodorsal amygdala in rats. *Physiology & Behavior.* 1994 May;55(5):963-966.
- [32] Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, et al. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology.* 2004 Nov;145:5087–5096.
- [33] Klöckener, T; Hess, S; Belgardt, BF; Paeger, L; Verhagen, LA; Husch, A; Sohn, JW; Hampel, B; Dhillon, H; Zigman, JM; Lowell, BB; Williams, KW; Elmquist, JK; Horvath, TL; Kloppenburg, P; Brüning JC. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat Neurosci.* 2011 Nov;14(7):911-8.
- [34] Könner, AC; Klöckener, T; Brüning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav.* 2009 Jul; 97(5):632-8.
- [35] Könner, AC; Hess, S; Tovar, S; Mesaros, A; Sánchez-Lasheras, C; Evers, N; Verhagen, LA; Brönneke, HS; Kleinridders, A; Hampel, B; Kloppenburg, P; Brüning JC. Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell Metab.* 2011 Jun;13(6):720-8.
- [36] Lawson EA, Holsen LM, Santin M, Meenaghan E, Eddy KT, Becker AE, et al. Oxytocin secretion is associated with severity of disordered eating psychopathology and insular cortex hypoactivation in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012 Oct;97:E1898–E1908.
- [37] Listenberger, LL, Ory, DS, Schaffer, JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem.* 2001 May;276:14890–14895.

- [38] Lioutas, C., Einspanier, A., Kascheike, B., Walther, N., Ivell, R. An autocrine progesterone positive feedback loop mediates oxytocin upregulation in bovine granulosa cells during luteinization. *Endocrinology*. 1997 Nov; 138:5059–5062.
- [39] Luquet, S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter, RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*. 2005 Oct;310:683–685.
- [40] Ma Y, Hendershot LM. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell*. 2001 Dec;107:827–830.
- [41] Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell Metab*. 2008 May;7(5):400–409.
- [42] Morton, GJ; Schwartz, MW. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):389-411.
- [43] Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J. Biol. Chem*. 2005 Jan; 280:847–851.
- [44] Obici, S; Feng, Z; Karkanias, G; Baskin, DG; Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*. 2002 Jun;5(6):566-72.
- [45] Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, Tamatani T, Yamagata K, Miyagawa J, Kitao Y, et al. The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* 2005 Mar;54:657–663.
- [46] Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004 Oct;306:457–461.
- [47] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006 Aug; 313:1137–1140.

- [48] Park-York M, Boghossian S, Oh H and York DA. PKC θ expression in the amygdala regulates insulin signaling, food intake and body weight. *Obesity*. 2013 Apr;21(4):755-64.
- [49] Paxinos, G; Franklin, KBJ. *The Mouse Brain Stereotaxic Coordinates*. 2001. Second Edition, Academic Press, San Diego.
- [50] Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. 2005 Mar;146:1576-1587.
- [51] Picardi PK, Calegari C, Prada PO, Moraes JC, Araújo E, Marcondes MCGG, Ueno M, Carnevalheira JBC, Velloso LA, Saad MJA. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet induce obese rats. *Endocrinology*. 2009 Aug;149(8):3870-3880.
- [52] Plum, L; Schubert, M; Brüning, JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Mar;16:59-65.
- [53] Primeaux SD, York DA, Bray GA. Neuropeptide Y administration into the amygdala alters high fat food intake. *Peptides*. 2006 Jul;27:1644–1651.
- [54] Purves D; Augustine JG; Fitzpatrick D; Hall CW; LaMantia A-S; McNamara OJ; White E. *Neurociências*. Porto Alegre: Artmed; 2010. Cap. 29. p. 742-743.
- [55] Ropelle, ER; Pauli, JR; Prada, P; Cintra, DE; Rocha, GZ; Moraes, JC; Frederico, MJ; Da Luz, G; Pinho, RA; Carnevalheira, JB; Velloso, LA; Saad, MA; De Souza, CT. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *J Physiol*. 2009 May; 587(10):2341-51.
- [56] Rother, E; Könnner, AC; Brüning, JC. Neurocircuits integrating hormone and nutrient signaling in control of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 May;294(5):810-6.
- [57] Samuel, VT, Petersen, KF, Shulman, GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010 Jun;375:2267-2277.

- [58] Sánchez-Lasheras, C; Könné, AC; Brüning, JC. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Jan;31(1):4-15.
- [59] Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000 Apr; 404: 661–671.
- [60] St. Andre J, Reilly S. Effects of central and basolateral amygdala lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition. *Behav Neurosci.* 2007 Dec; 121:90–99.
- [61] Stoeckel LE, Weller RE, Giddings M, Cox JE. Peptide YY levels are associated with appetite suppression in response to long-chain fatty acids. *Physiol Behav.* 2008 Jan; 93:(1-2):289-95.
- [62] Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res.* 2006 Jan;45(1):42–72.
- [63] Tye, KM; Prakash, R; Kim, S; Fenno, LE; Grosenick, L; Zarabi, H; Thompson, K; Grandinaru, V; Ramakrishnan, C; Deisseroth, K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature.* 2011 Mar;471:358-362.
- [64] Turpin S M, Lancaster G I, Darby I, Febbraio M A, Watt M J. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006 Dec; 291: E1341–E1350.
- [65] Unger, RH; Orci, L. Lipoapoptosis: Its mechanism and its diseases. *Biochim. Biophys Acta.* 2002 Dec;1585:202–212.
- [66] van Zessen, R; van der Plasse, G; Adan, RA. Contribution of the mesolimbic dopamine system in mediating the effects of leptin and ghrelin on feeding. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2012 Nov;71:435–445.
- [67] Volkow, ND; Wang, GJ; Baler, RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci.* 2011 Jan;15(1):37-46.
- [68] Xu, AW; Kaelin, CB; Takeda, K; Akira, S; Schwartz, MW; Barsh, GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115:951-8.

- [69] White, MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997 Jul;40:S2-17.
- [70] Wanderley EN, Ferreira VA. Obesity: a plural perspective. *Ciênc. saúde coletiva* [serial on the Internet]. 2010 Jan [cited 2013 July 25] ; 15(1): 185-194. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232010000100024&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- [71] Won JC, Jang PG, Namkoong C, Koh EH, Kim SK, Park JY, Lee KU, Kim MS. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Oct; 17(17): 1861–1865.
- [72] Yu, JH; Kim, MS. Molecular Mechanisms of Appetite Regulation. *Diabetes Metab J*. 2012 Dec;36:391-398.
- [73] Yamamoto T. Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem Senses*. 2007 Jan;32:105–109.
- [74] Yamano Y, Yoshioka M, Toda Y, Oshida Y, Chaki S, Hamamoto K, Morishima I. Regulation of CRF, POMC and MC4R gene expression after electrical foot shock stress in the rat amygdala and hypothalamus. *J Vet Med Sci*. 2004 Nov;66:1323–1327.
- [75] Zhang P, McGrath B, Li S, Frank A, Zambito F, Reinert J, Gannon M, Ma K, McNaughton K, Cavener DR. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol. Cell. Biol*. 2002 Jun;22:3864–3874.
- [76] Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008 Oct;135:61–73.
- [77] Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai, D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2009 Oct;135(1):61-73.
- [78] Zhang W, Hietakangas V, Wee S, Lim SC, Gunaratne J, Cohen SM. ER stress potentiates insulin resistance through PERK-mediated FOXO phosphorylation. *Genes Dev*. 2013 Feb;15,27(4):441-9.



CEUA/Unicamp

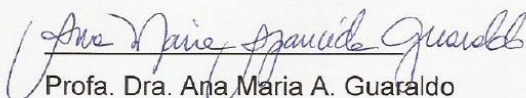
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

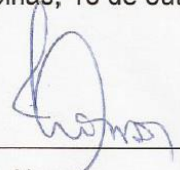
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "REGULAÇÃO DA AÇÃO E SINALIZAÇÃO DE INSULINA E LEPTINA EM STRIATUM DE ANIMAIS CONTROLES E OBESOS: EFEITOS NA INGESTÃO ALIMENTAR, VIA INFLAMATÓRIA E STRESS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO" (protocolo nº 2526-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada / Gisele de Castro, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 18 de outubro de 2011.

Campinas, 18 de outubro de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva