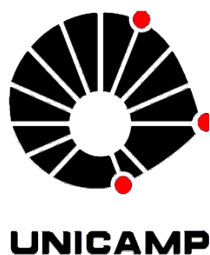




CARLA GRAZIELLE BUENO SILVA

SINALIZAÇÃO DE LEPTINA E REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS OBESOS

Campinas
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Carla Grazielle Bueno Silva

**SINALIZAÇÃO DE LEPTINA E REGULAÇÃO DA
PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS OBESOS**

Orientador: Mario Jose Abdalla Saad

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Mestra em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
APRESENTADA PELA ALUNA CARLA GRAZIELLE BUENO SILVA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD.

Assinatura do Orientador:

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38s Silva, Carla Grazielle Bueno, 1987-
Sinalização de leptina e regulação da pressão arterial
em ratos obesos // Carla Grazielle Bueno Silva. --
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Mario Jose Abdalla Saad.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leptina. 2. Obesidade. 3. Hipertensão. I. Saad,
Mario Jose Abdalla, 1956-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Leptin signalling and blood pressure regulation in obese rats

Palavras-chave em inglês:

Leptin

Obesity

Hypertension

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Mario Jose Abdalla Saad [Orientador]

Mario Luis Ribeiro Cesaretti

Jose Antonio Rocha Gontijo

Data de defesa: 30-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CARLA GRAZIELLE BUENO SILVA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD



2. PROF(A). DR(A). MARIO LUIS RIBEIRO CESARETTI



3. PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de abril de 2014

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	5
1.INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Obesidade e Hipertensão	8
1.2 Leptina.....	9
1.3 Sítios de atuação da leptina no Sistema Nervoso Central (SNC) - Sistema Melanocortinérgico.....	11
1.4 Vias de Sinalização da Leptina.....	14
1.5 Resistência Seletiva à Leptina.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos Gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Implante das Cânulas por Estereotaxia e Administração das Substâncias.....	24
3.3 Peso Corporal, Avaliação da Ingestão, Gasto Energético e Pressão Arterial.....	25
3.4 Extração de Hipotálamo e Western Blotting.....	27
3.5 Soluções utilizadas:.....	28
3.6 Modo de Análise dos Resultados.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Obesidade induzida por dieta hiperlipídica leva à resistência às ações metabólicas da leptina.....	31
4.2 Leptina promove alterações cardiovasculares tanto em animais magros como em obesos.....	34
4.3 A via de sinalização hipotalâmica de leptina é ativada de maneira diferente em animais magros e obesos.....	36
5. DISCUSSÃO.....	39
6.CONCLUSÃO.....	44
7.REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AGRP - *Agouti-related peptide*
ARQ - Núcleo arqueado do Hipotálamo
CART - Fator de Transcrição Cocaína-Anfetamina Dependente
DH - Dieta Hiperlipídica
EP - Erro Padrão
ICV - Intracerebroventricular
IRS2 - *Insulin Receptor Substrate 2*
Jak2 - *Janus kinase 2*
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
HL - Hipotálamo Lateral
MPA - Média da Pressão Arterial
MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCR - *Melanocortin Receptor*
MSH - *Melanocyte-Stimulating Hormone*
NPV - Núcleo Paraventricular do hipotálamo
NPY - Neuropeptídeo Y
NTS - Núcleo do Trato Solitário do Hipotálamo
NSR - Nervo Simpático Renal
ObRb - *Ob Receptor b* (Receptor de leptina)
PAS - Pressão Arterial Sistêmica
PI3K - *Phatidylinositol 3-Kinase*
POMC - Proopiomelanocortina
PTP1B - *Protein-Tyrosine Phosphatase 1B*
RP - Ração Padrão
RSL - Resistência Seletiva à Leptina
SNC - Sistema Nervoso Central
SNS - Sistema Nervoso Simpático
SOCS3 - *Suppressor of Cytokine Signaling 3*
Stat3 - *Signal transducer and activator of transcription 3*
TAM - Tecido Adiposo Marrom
VDM - *Núcleo Dorsal Motor do Vago*
VM - Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Sítios de atuação da leptina.....	12
Figura 2. Sistema de melanocortina.....	13
Figura 3: Sinalização do Receptor de Leptina.....	16
Figura 4. Pressão arterial em animais transgênicos Ob/Ob e com Superexpressão de Leptina	18
Tabela 1: Composição das Dietas Padrão e Hiperlipídica.....	24
Figura 5. Efeitos metabólicos da leptina.....	33
Figura 6. Efeitos cardiovasculares da leptina.....	35
Figura 7. Sinalização hipotalâmica de leptina.....	38
Figura 7 (continuação). Sinalização hipotalâmica de leptina.....	39

RESUMO

A leptina é um polipeptídeo derivado do tecido adiposo e tem como principal função informar o estado nutricional do indivíduo a centros hipotalâmicos, que por sua vez regulam a ingestão e o gasto energético. Tais ações são orquestradas pela fosforilação do receptor ObRb em tyr 985 e 1138, sendo esta última relacionada ao metabolismo e à via da Stat3. Recentemente foi demonstrado que os altos níveis séricos de leptina, presentes na obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH), correlacionam-se fortemente com hipertensão arterial. Por outro lado, indivíduos obesos possuem resistência às ações metabólicas da leptina (saciedade e termogênese). Para investigar as vias moleculares hipotalâmicas que caracterizam a atividade seletiva da leptina sobre o efeito de aumento da pressão arterial, ratos Sprague Dawley adultos foram alimentados com ração padrão (RP) ou DH por três meses e submetidos à injeção crônica intracerebroventricular de leptina (2µg/dia) ou salina (2µl) por 10 dias. Pressão Arterial Sistêmica (PAS), ingestão e gasto energético foram avaliados antes e depois do tratamento. O grupo RP+leptina teve redução de ingestão de 109,48±8,48 para 57,3±7,04 kcal/dia, aumento do gasto energético de 85,6±1,87 para 94,4±0,58 kcal/dia/kg^{0,75} e consequente redução de peso de 15,25±3,54 g (P<0,0001 todos os dados), o que não ocorreu no grupo DH+leptina. Porém, tanto no grupo RP como em DH, a leptina causou aumento da PAS de 10,44±0,12% e 14,22±1,9%, respectivamente. Como esperado, animais obesos apresentaram valores aumentados de leptina sérica, quando comparados ao grupo RP (RP: 2,24±0,38 ng/dl e DH:

9,88±1,82 ng/dl, $p<0,05$). Adicionalmente, foram avaliadas as principais vias de sinalização ativadas por leptina no hipotálamo. No grupo RP+leptina houve aumento significativo da atividade das proteínas Stat3, Akt e expressão de MAPK 1 e 2 (MAPK). No entanto, no grupo DH+leptina, foi observado apenas aumento da expressão da via da MAPK. Ambos os grupos DH e RP tratados com leptina apresentaram maior fosforilação de ObRb tyr985 de maneira semelhante, o que não foi observado em relação à ObRb tyr1138. É possível notar que a via dependente de ObRb tyr985 encontra-se responsiva à leptina em DH e RP e que ObRb tyr1138 bem como a proteína relacionada Stat3 e Akt estão reduzidas em animais obesos. Desta forma, pode-se sugerir que na obesidade induzida por DH, a via hipotalâmica ObRb tyr985 / MAPK, diferentemente das outras vias, não fica resistente e pode estar relacionada às ações cardiovasculares da leptina.

Palavras-chave: *hipertensão, obesidade, leptina*

ABSTRACT

Leptin is an adipose tissue-derived polypeptide and its main function is to inform the individual's nutritional status to hypothalamic centers, which in turn regulate food intake and energy expenditure. Such actions are orchestrated by phosphorylation of ObRb receptor on tyrosine 985 and 1138, the latter is related to metabolism and Stat3 pathway. Recently it was demonstrated that high serum levels of leptin, which is seen in diet-induced-obesity, correlates strongly with hypertension. On the other hand, obese individuals have resistance to metabolic actions of leptin (satiety and thermogenesis). To investigate the molecular hypothalamic pathways that characterize the selective activity of leptin on the effect of blood pressure increase, adults Sprague Dawley rats were fed with standard diet (SD) or high fat diet (HFD) for three months and were submitted to chronic intracerebroventricular injection of leptin (2 µg/dia) or saline (2 µl) for 10 days. Blood pressure (BP), food intake and energy expenditure were assessed before and after treatment. SD + leptin group had reduced food intake from 109,48±8,48 to 57,3±7,04 kcal / day, increased energy expenditure from 85,6±1,87 to 94,4±0,58 kcal/day/kg^{0,75} and consequently weight reduction of 15,25±3,54 g (P <0.0001 all) which did not occur in HFD + leptin. However, both SD and HFD group, leptin increased BP of 10.44 ± 0.12 % and 14.22 ± 1.9%, respectively. As expected, obese animals had elevated levels of serum leptin when compared to SD group (SD: 2,24±0,38 ng/dl and HFD: 9,88±1,82 ng/dl, p<0,05). Additionally, we evaluate the main activated signal pathways by leptin in hypothalamus. SD + leptin group showed a significant increase in

activity of Stat3, Akt and in MAPK expression. However, DH + leptin manifested an increase only on the expression of MAPK pathway. Both SD and HFD leptin-treated groups had higher ObRb tyr985 phosphorylation, which was not observed with the ObRb tyr1138. It was possible to see that ObRb tyr985 dependent pathway is responsive to leptin in SD and HFD, and ObRb tyr1138 as well as the related protein Stat3 and Akt are reduced in obese animals. Therefore, it may be suggested that in HFD-induced obesity, hypothalamic pathway ObRb tyr985 / MAPK, unlike the other pathways, is not resistant and can be related to cardiovascular actions of leptin.

Keywords: *hypertension, obesity, leptin*

1.INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Hipertensão

A obesidade é um dos problemas mais importantes que a Saúde Pública enfrenta atualmente em diversos países do mundo. A prevalência desta doença cresceu aproximadamente 100% desde a década de 80 e atinge todos os segmentos da sociedade, sendo mais acentuada nos centros urbanos (1). Pesquisa realizada no Brasil, em 2012, aponta que cerca de 51% da população está acima do peso e outros 17% são obesos (2).

Esta morbidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal, causado por um desequilíbrio energético crônico, reflexo das mudanças nos padrões de ingestão alimentar e de atividade física. O indivíduo adulto é considerado obeso quando seu índice de massa corpórea (IMC) é maior ou igual a 30. Para a definição do estado nutricional de crianças e adolescentes existem padrões específicos baseados no sexo e idade (51).

A obesidade possui uma íntima ligação com a síndrome metabólica, caracterizada pela alteração de fatores metabólicos, tais como dislipidemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e cardiovasculares, como Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) (1, 3).

A partir da década de 30, alguns trabalhos começaram a relacionar o excesso de peso corporal ao aumento da Pressão Arterial Sistêmica (PAS). Por meio de um estudo retrospectivo com registros de 5.031 soldados, Reed e Love (1933) observaram que

aqueles que apresentavam peso corporal acima da média eram diagnosticados com HAS 20 a 30 anos mais tarde (4). Recentemente, estudos de coorte mostram que a PAS é diretamente proporcional ao ganho de peso, tanto em indivíduos obesos, como em indivíduos com sobrepeso (5). Além disso, outros trabalhos indicam que cerca de 60% das pessoas diagnosticadas com HAS possuem IMC elevado, sugerindo que a maioria dos casos de HAS estejam associados ao excesso de peso (6).

A fisiopatologia da hipertensão induzida por obesidade é complexa e pode ter múltiplos mecanismos de desenvolvimento, tais como a estimulação do Sistema Nervoso Simpático (SNS), ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e alterações nos níveis circulantes de adipocinas, dentre as quais a leptina. (7) Além disso, foi comprovado que os níveis cronicamente elevados de leptina sérica, observados em indivíduos obesos, possuem um papel de extrema relevância no desenvolvimento da HAS (8).

1.2 Leptina

Desde a descoberta da leptina, em 1994, mudou-se substancialmente a visão que se tinha do tecido adiposo, que passou de apenas um órgão de estoque de energia para um órgão ativo, capaz de secretar diversos peptídeos bioativos (adipocinas) e inflamatórios (9, 10). A leptina é uma adipocina com um papel crucial na regulação de inúmeras funções endócrinas, na homeostase energética, na reprodução e no estímulo ao SNS (8, 9).

Esta proteína de 16 kDa, composta por 167 aminoácidos, é expressa e secretada de maneira proporcional ao tamanho e número de adipócitos. Sendo assim, a leptina circula no plasma em uma concentração altamente correlacionada à massa de gordura corporal (42). A secreção de leptina diminui com o jejum prolongado e estímulo β -adrenérgico, enquanto aumenta em resposta à administração de insulina e glicocorticóides e ocorre de forma pulsátil e inversamente relacionada à atividade do eixo ACTH-Cortisol. Portanto, é diminuída ao amanhecer e aumentada no final da tarde (11).

A leptina - do grego leptos = magro - atua no controle do balanço energético e peso corporal, levando informações do estado nutricional aos centros hipotalâmicos que, por sua vez, regulam o balanço energético por meio da supressão do apetite e aumento da termogênese (12).

Sabe-se que deficiência de leptina resulta em obesidade mórbida em modelos animais e humanos (15). No entanto, a deficiência deste hormônio por mutação genética é rara na espécie humana. A maioria das pessoas obesas apresenta níveis elevados de leptina, sugerindo que indivíduos obesos apresentam resistência aos seus efeitos anorexigênicos e termogênicos (14).

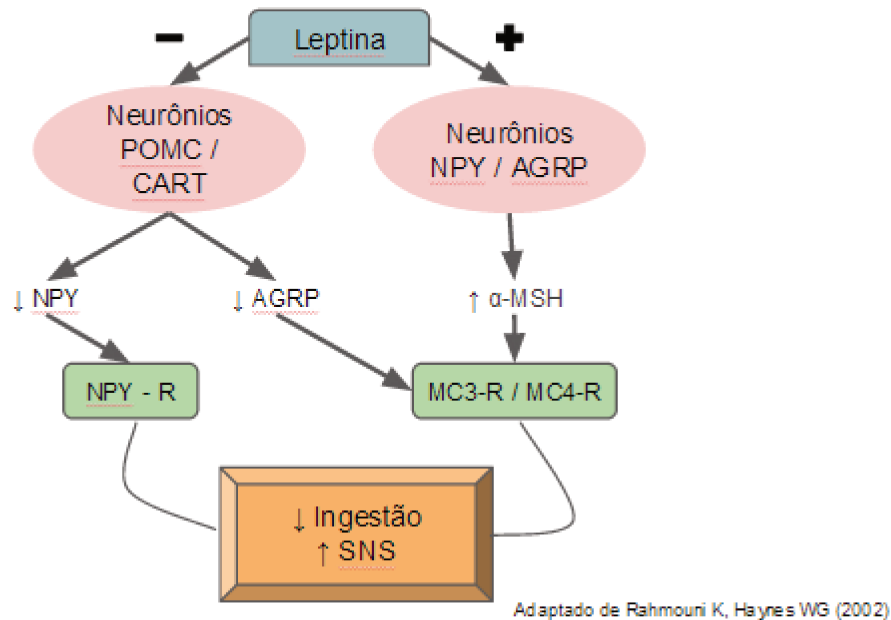
Além da atuação no controle do apetite e metabolismo, a leptina possui uma importante função na modulação do SNS, promovendo o aumento da atividade simpática de diversos órgãos e sistemas, como músculo esquelético, tecido adiposo marrom (TAM) e nervo simpático renal (NSR). Por meio da ativação do NSR, ocorre aumento da reabsorção tubular de sódio, acarretando na elevação da PAS. Desta forma, a leptina modula o sistema cardiorrenal e pode contribuir para o

desenvolvimento de HAS em indivíduos obesos, ou seja, indivíduos que em geral apresentam altos níveis séricos de leptina. Corroborando com esta informação, Aizawa-Abe e cols (2000) inferiram que camundongos transgênicos que superexpressam leptina apresentam PAS significativamente maior do que seus controles selvagens, apesar da redução do peso corporal (28). Em contraste, indivíduos que possuem a rara condição de deficiência genética de leptina apresentam PAS normal ou baixa, apesar do excesso de peso (14).

1.3 Sítios de atuação da leptina no Sistema Nervoso Central (SNC) - Sistema Melanocortinérgico

A leptina atua no Sistema Nervoso Central (SNC) dando origem a respostas neuronais integradas necessárias para modular a ingestão alimentar, e, por meio da ativação do SNS, o gasto energético e a atividade do NSR. Seus efeitos metabólicos se dão por meio da interação do hormônio com seus receptores, amplamente expressos em neurônios produtores de neuropeptídeos e neurotransmissores. Particularmente, a leptina age de modo distinto em quatro peptídeos produzidos em neurônios hipotalâmicos: o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo relacionado à cepa agouti (AGRP), o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART) e a pró-opiomelanocorticotropina (POMC). Postula-se que a leptina suprima a atividade dos neurônios que produzem NPY/AGRP (efeito orexígeno) e que ela estimule a atividade de neurônios produtores de CART ou POMC (efeito anorexígeno) (44) (figura 1).

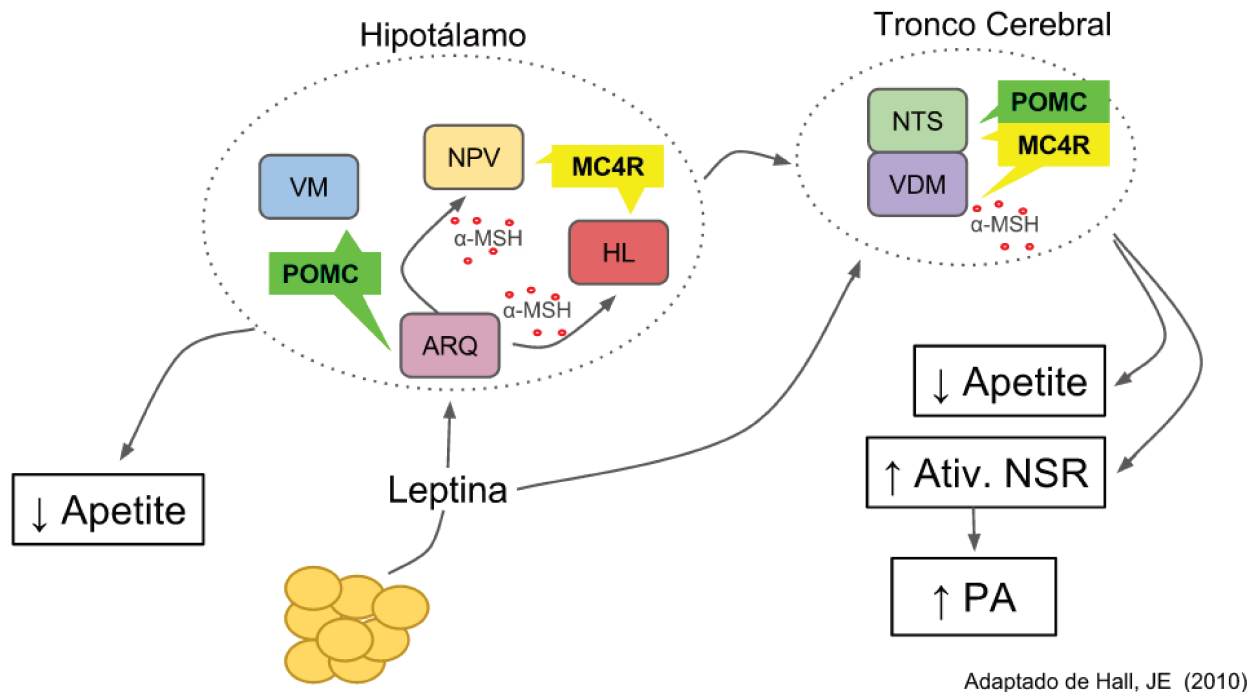
Figura 1. Sítios de atuação da leptina



Estudos nos quais a leptina foi injetada em regiões específicas do cérebro, como no Núcleo Arqueado e Núcleo do Trato Solitário, sugerem que nessas regiões há regulação diferencial do apetite, do consumo alimentar e da ativação do SNS. Nessas áreas estão localizados neurônios que expressam proopiomelanocortinas (POMC) (21). Muitas funções essenciais da leptina no SNC estão relacionadas a esses neurônios.

A proteína precursora POMC produz muitos peptídeos ativos, tais como corticotrofina (ACTH), β -endorfina e hormônios estimulantes de melanócitos (α e β -MSH). O α -MSH se liga aos receptores de melanocortina (MCRs), os quais existem 5 subtipos. Dentre eles, o MC3-R e MC4-R apresentam larga expressão no SNC (21, 22) (figura 2).

Figura 2. Sistema de melanocortina



Kuo e cols. (2003) comprovaram que a ativação farmacológica dos receptores MC3/4R do SNC de ratos aumenta a PAS enquanto diminui o apetite e causa redução de peso. Além disso, o bloqueio destes mesmos receptores em roedores induz alimentação voraz e ganho de peso, enquanto reduz a PAS (23). Além disso, a deleção de ObRb em neurônios POMC também preveniu o aumento da PAS induzido por leptina (16). Portanto, além de ser uma via fundamental na regulação do balanço energético, a ativação do sistema POMC-MC3/4R no SNC é necessária para os efeitos crônicos da leptina no desenvolvimento de HAS em indivíduos obesos.

Assim, o mecanismo molecular pelo qual a leptina estimula os neurônios POMC e desencadeia a ativação do sistema de melanocortinas é um importante alvo de investigação para melhor entendimento da fisiopatologia da obesidade.

1.4 Vias de Sinalização da Leptina

Existem pelo menos seis isoformas do receptor de leptina, denominados ObRa-f. Camundongos apresentam apenas 5 isoformas. A forma curta do receptor, ObRa, é expressa em vários tecidos, não tem sua função bem definida, mas parece influir no transporte da leptina através da barreira hematoencefálica e talvez contribua para a depuração da leptina atuando como uma fonte de receptor solúvel (38). A forma longa, ObRb, apresenta domínios intracelulares longos e é largamente expressa no hipotálamo (núcleos paraventricular, arqueado, ventromedial e dorsomedial), onde há grande expressão de neurônios POMC (13).

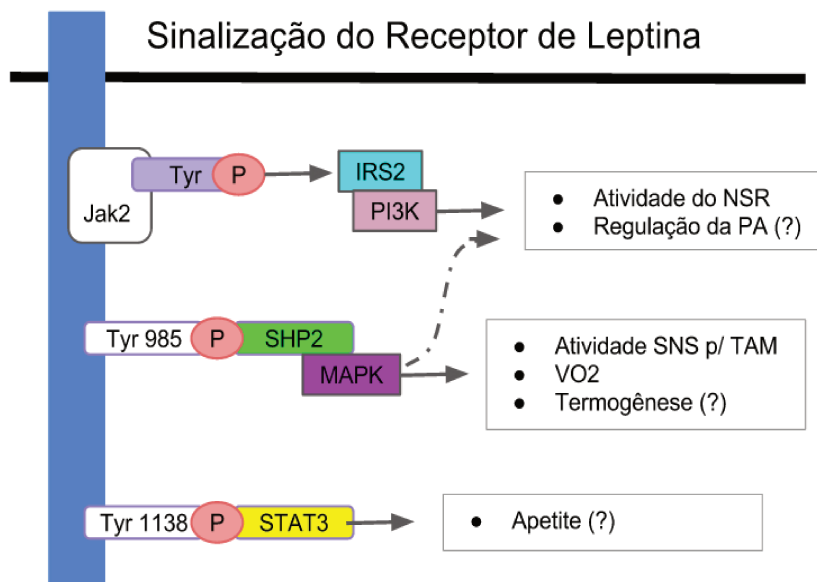
O receptor ObRb é ligado à proteína citosólica *Janus kinase – 2* (JAK-2). Tipicamente, as proteínas JAK estão constitutivamente associadas com seqüências de aminoácidos dos receptores, e adquirem sua atividade tirosina quinase após a ligação do hormônio em seu receptor. Uma vez ativada, ocorre o recrutamento de outra unidade de receptor que se encontra nas adjacências, formando assim uma estrutura transitoriamente dimérica. Ocorre então uma modificação conformacional que induz a atividade catalítica da enzima JAK-2 associada, a qual se autofosforila em vários resíduos tirosina, tornando-se assim ativa para que, a seguir, fosforile e ative a outra

molécula de JAK-2 ligada ao segundo receptor. Em seguida, as JAK-2 ativas catalisam a fosforilação dos receptores ObRb nas tirosinas 985 e 1138 (12).

No SNC, a JAK-2 associada ao ObRb e ativada pode estimular três vias de sinalização, sendo elas (figura 3):

- Fosforilação do Subtrato do Receptor de Insulina 2 (IRS2 - *Insulin Receptor Substrate 2*), que ativa a Fosfatidil-inositol 3 Quinase (PI3K - *Phatidylinositol 3-Kinase*) e, conseqüentemente, promove a fosforilação de Akt (Proteína kinase B) (23),
- Fosforilação de ObRb em tirosina 1138, que recruta os transdutores de sinais e ativadores de transcrição 3 (Stat3 - *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) para o complexo ObRb-JAK-2, resultando em fosforilação e translocação do Stat3 para o núcleo, onde ocorre a transcrição e,
- Fosforilação de ObRb em tirosina 985, a qual recruta a tirosina fosfatase SHP2, que então ativa a via da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*);

Figura 3: Sinalização do Receptor de Leptina



Adaptado de Hall, JE (2010)

A sinalização da leptina sofre influência de duas proteínas inibitórias: proteína SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*) e PTP1B (*Protein-Tyrosine Phosphatase 1B*).

A atividade da SOCS3 resulta de sua ligação tanto à proteína Jak2, como ao receptor ObRb, causando a inibição da ativação de STAT3. Kievit e cols. (2006), utilizaram camundongos haploinsuficientes para SOCS3 em células neuronais que expressam POMC para avaliar sua importância no controle central da ingestão alimentar. A deficiência crítica de SOCS3 nesta população específica de neurônios aumentou a sensibilidade à leptina, promovendo redução na ingestão alimentar e peso corporal após a infusão intracerebroventricular (ICV) de leptina. Além disso, o estudo

demonstrou que a deleção da SOCS3 aumentou o gasto energético nesses animais (45).

A enzima PTP1B tem ligação direta com os receptores de leptina e atua como regulador negativo da via de sinalização Jak / Stat (45). Bence e cols. (2006) mostraram que camundongos que não expressam a PTP1B especificamente no hipotálamo possuem hipersensibilidade à leptina e não desenvolvem obesidade mesmo sendo alimentados com dieta rica em gordura, evidenciando a importância da participação desta proteína em células neuronais para o controle do apetite e do peso corporal em roedores.

Evidências experimentais indicam que ambas (SOCS3 e PTP1B) tem sua expressão hipotalâmica aumentada na obesidade induzida por Dieta Hiperlipídica (DH) (37, 41). Consequentemente, essas proteínas estão envolvidas com a resistência à leptina, observada em indivíduos obesos.

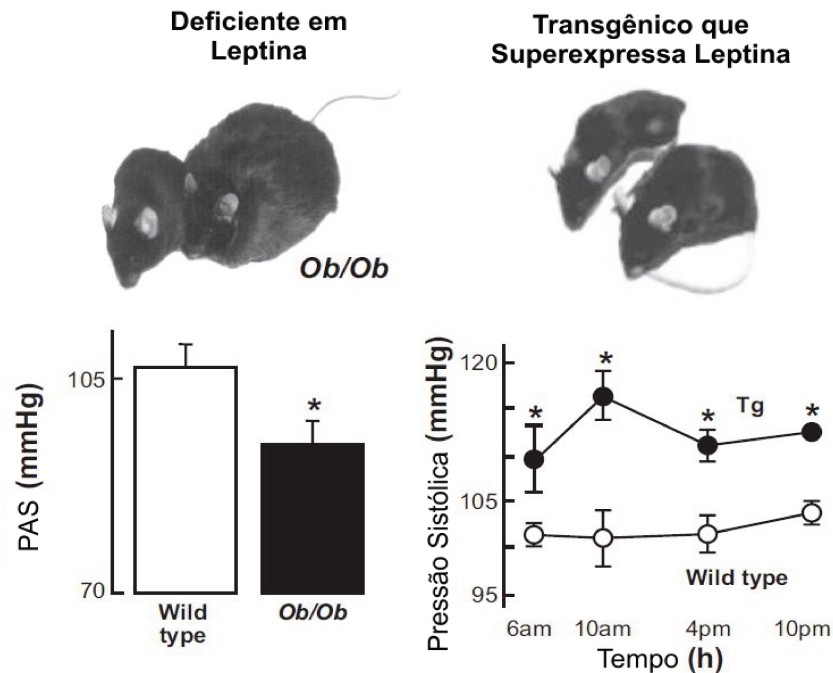
1.5 Resistência Seletiva à Leptina

Além da regulação do balanço energético, a leptina exerce função em diversos sistemas neuroendócrinos e fisiológicos, incluindo a ativação do SNS (16). Entretanto, diversos modelos de obesidade exibem resistência aos seus efeitos anorexigênicos e de redução de peso, com preservação de suas ações simpatoexcitatórias (9, 13).

Em 2002, Correia e cols. realizaram um trabalho utilizando o camundongo *agouti yellow*, modelo experimental de obesidade. A HAS neste animal é atribuída à

hiperleptinemia devido à hipertatividade do SNS. Porém, ele é resistente às ações metabólicas da leptina. Essas observações levaram os pesquisadores a testar uma nova hipótese de que este camundongo possui uma Resistência Seletiva à Leptina (RSL), com preservação das ações sobre a pressão arterial apesar da resistência às ações de redução de peso (17) (figura 4).

Figura 4. Pressão arterial em animais transgênicos Ob/Ob e com Superexpressão de Leptina



Adaptado de Mark e cols, 2013. Esquerda: dados para MPA em animais selvagem vs Ob/Ob. Direita: Pressão arterial sistólica de animal selvagem vs skinny, camundongo transgênico que superexpressa leptina. Camundongo deficiente em leptina teve menor PAS do que o controle selvagem, enquanto o skinny teve maior pressão arterial sistólica do que o controle selvagem. Tg=Transgênico. *P 0,05

Algum tempo depois, outros trabalhos sugeriram o desenvolvimento do fenômeno da RSL em diversos modelos animais. Do Carmo e cols. (2011) realizaram a deleção do receptor ObRb em hipotálamo de camundongos e observaram uma redução da PAS, apesar do surgimento de obesidade e hiperfagia (18). Em humanos obesos, a leptina também está relacionada ao aumento da atividade do SNS e da PAS (19).

Alguns mecanismos são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento da resistência à leptina, como a redução do transporte desse hormônio através da barreira hematoencefálica, impedindo sua chegada ao fluido intersticial cerebral (19). Níveis elevados de triglicérides inibem o transporte de leptina pela barreira hemato-encefálica, e podem parcialmente explicar a redução da eficiência do transporte de leptina na obesidade. No entanto, os mecanismos envolvidos ainda são incertos e não se aplicam à resistência seletiva ao hormônio (47).

A identificação do receptor de leptina no hipotálamo e a avaliação do grau de fosforilação de proteínas chaves na propagação do sinal na via de sinalização da leptina, levaram a uma melhor compreensão de como acontece a sinalização celular. Evidências recentes sugerem que a ativação de diferentes cascatas de sinalização intracelular por estímulos de leptina em seu receptor pode fornecer uma base para o fenômeno da RSL (13).

A via PI3K / Akt foi associada à transdução de sinais que promovem a redução do consumo alimentar através da ação da leptina. A infusão de LY294002, um inibidor farmacológico de PI2K no hipotálamo de camundongos promoveu redução na ingestão induzida por leptina, porém, não inibiu as respostas anorexigênicas relacionadas à

estimulação dos receptores de melanocortina (16). No entanto, outro estudo recente demonstrou que animais que apresentavam hiperativação da via de sinalização PI3K tinham a atividade do NSR aumentada, e, conseqüentemente, eram hipertensos (19).

Camundongos com deleção genética de Stat3 são hiperfágicos, possuem menor atividade termogênica pelo TAM (baixa atividade de UCP1) e apresentam alto grau de obesidade, sugerindo que a via de sinalização Stat3 medeia o metabolismo termogênico induzido por leptina no TAM. Entretanto, a deleção de Stat3 não causou alterações no NSR, isso indica que a via Stat3 não contribui para o aumento da atividade do nervo simpático renal promovida pela leptina no hipotálamo (16). O contraste entre o papel de Stat3 na ativação simpática no TAM e para a atividade do NSR são um exemplo do controle diferencial do sistema nervoso autônomo para diferentes tecidos e órgãos.

A ativação de MAPK (ou ERK 1 / 2 - *Extracellular Signal-regulated Kinase*) é mediada através da Proteína Tirosina-Fosfatase 2 (SHP2 - *protein tyrosine-phosphatase*) que emana do resíduo de tirosina 985 do receptor ObRb e através de interação direta com Jak2. Foi demonstrado que a MAPK exerce um importante papel na regulação do consumo alimentar, peso corporal e atividade termogênica mediados pela leptina. Essas funções são dependentes de Jak2 (50). A administração ICV de antagonistas de MAPK (PD98059 e U0165) bloqueou a diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal com a administração sistêmica de leptina. Porém, o papel da sinalização leptina-MAPK na regulação da PAS na obesidade ou durante a administração de leptina ainda não está claro na literatura (16).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo principal do estudo foi caracterizar os mecanismos moleculares da Resistência Seletiva à Leptina no hipotálamo de ratos obesos, procurando relacionar a atividade das vias de sinalização dependentes da ativação de ObRb aos efeitos fisiológicos deste hormônio.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos metabólicos do tratamento crônico ICV no período de 10 dias com leptina por meio da avaliação da ingestão alimentar, consumo de O₂, produção de CO₂ e gasto energético em ratos alimentados com ração padrão ou dieta hiperlipídica;
- Avaliar a PAS antes e depois do tratamento crônico central com leptina em ratos magros e obesos;
- Quantificar os níveis séricos de leptina em animais alimentados com RP ou DH, tratados por 10 dias com leptina ICV;
- Avaliar a expressão das proteínas inibidoras SOCS3 e PTP1B em hipotálamo de animais alimentados com RP ou DH, tratados com leptina ICV por 10 dias, pela técnica de Western Blot;
- Analisar a ativação e expressão de proteínas das vias de sinalização

hipotalâmicas de leptina: Jak2, Stat3, Akt e MAPK em ratos obesos tratados com leptina, pela técnica de Western Blot;

- Avaliar o perfil de ativação do receptor de leptina ObRb, bem como a fosforilação de seus resíduos de tirosina 985 e 1138 no hipotálamo desses mesmos animais, pela técnica de Western Blot; .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Sprague Dawley machos com 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp foram acondicionado sem gaiolas plásticas, contendo 3-4 animais/caixa em ambiente mantido a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro-escuro fixos (12/12 horas), recebendo água potável e ração padrão (vide tabela 1) por 2 semanas.

Após este período, os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: grupo DH, alimentado com dieta hiperlipídica (consistindo de 55% das calorias oriundas de gordura saturada (banha de porco), 29% de carboidratos e 16% de proteínas) e grupo RP, alimentado com ração padrão (constituída de 70% de carboidrato, 20% de proteína e 10% de gordura), por um período de 10 semanas.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA – Unicamp, número de protocolo 3071-1.

Tabela 1: Composição das Dietas Padrão e Hiperlipídica

Ingredientes	Ração padrão (g/Kg)	Kcal/Kg	DHL (g/Kg)	Kcal/Kg
Amido de milho	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Açúcar	100	400	100	400
Amido dextrinizado	132	528	132	528
Gordura saturada	-	-	312	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura de minerais	35	-	35	-
Mistura de vitaminas	10	-	10	-
L-cystina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

3.2 Implante das Cânulas por Estereotaxia e Administração das Substâncias

Após o período de ganho de peso, para implante da cânula, os roedores foram submetidos à anestesia intraperitoneal com uma solução de Quetamina + Xilasina na dose de 80mg/kg e 20mg/kg, respectivamente. Quando os reflexos corneano e de retirada da pata à dor foram abolidos, os animais foram posicionados no aparelho esterotático (*Insight Ltda.*) para implante de cânula no terceiro ventrículo, de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos, 1944 (25).

Após a fixação da cabeça do animal e assepsia da região craniana, foi feita uma incisão de aproximadamente 1cm. O perióstio foi aberto expondo a sutura sagital. O bregma foi usado como ponto de referência e um orifício foi perfurado no osso parietal

na junção das coordenadas: anterolateral: 0,0mm; anteroposterior: -1,8mm e dorsoventral: -5mm.

A cânula era posicionada no orifício central e rebaixada cuidadosamente até que a coordenada dorsoventral era alcançada e a mesma era fixada no crânio por meio de uma resina polimerizante. Após a secagem da resina o animal era retirado do aparelho e permanecia de 6-7 dias se recuperando do procedimento cirúrgico. Foi administrado analgésico Dipirona Sódica infantil na água dos animais 1ml/100ml por um período de três dias a partir do dia da cirurgia. Após 7 dias da canulação, para confirmação da posição das cânulas, foi feita uma injeção ICV de angiotensina II, que induz efeito dipsinogênico (26).

Após a recuperação e teste de angiotensina II, ambos os grupos (RP e DH) foram divididos novamente, formando no total 4 grupos: RP+salina, RP+leptina, DH+salina, DH+leptina. Os animais foram submetidos a um tratamento crônico ICV onde foram injetados leptina (Alexis Biochemicals, CA) (2µg/dia) ou solução de controle salina (2µl/dia) por um período de 10 dias, sempre no mesmo horário, 18-19h. Para a injeção da solução foi utilizado um catéter acoplado à seringa Hamilton em escala de µl.

3.3 Peso Corporal, Avaliação da Ingestão, Gasto Energético e Pressão Arterial

Os animais foram pesados antes e após o tratamento crônico. Para a avaliação da ingestão, os roedores foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais. A ingestão foi medida diariamente durante o tratamento com leptina por um período de 5

dias.

O consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono foram medidos no quarto e quinto dias de tratamento por meio de um calorímetro de circuito aberto para calcular o gasto energético total. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por um período de 24h com um tempo adicional de 3 horas para a aclimação. O consumo de O₂ e produção de CO₂ eram medidos em intervalos de 3 minutos durante 24h.

A PAS e frequência cardíaca foram avaliadas no dia anterior ao início do tratamento ICV e ao final dos 10 dias de tratamento. Foi utilizado um método não invasivo do tipo *tail-cuff* (*BP-2000 Blood Pressure Analysis System*) em ratos acordados. O animal era acondicionado em um contensor, que limitava seus movimentos e o mantinha em temperatura de 36°, para a indução da vasodilatação, que se faz necessária na verificação da PAS. Uma bainha inflável era colocada na cauda do animal, que ficava fora do contensor. A pressão na bainha pneumática, a qual é conectada ao equipamento, era aumentada acima da pressão sistólica e, então, lentamente liberada. Os resultados da pressão sistólica, diastólica e frequência cardíaca eram registrados pelo software do equipamento. A PAS foi registrada pelo menos dez vezes em ciclos consecutivos (inflação/deflação) para cada rato. Os valores das aferições eram aceitáveis quando a diferença entre os valores não passavam de 10mmHg. Antes da realização das aferições, os animais passaram por três dias de adaptação ao equipamento, ficando aproximadamente 10 minutos no aparelho.

3.4 Extração de Hipotálamo e Western Blotting

No décimo primeiro dia, após a realização do tratamento crônico, os animais foram anestesiados e sacrificados por decapitação. Logo depois, o hipotálamo inteiro dos animais foi extraído e homogeneizado em tampão de extração composto por Triton-X 100 1%, TRIS (pH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e aprotinina 0,1mg/ml, a 4°C.

Os extratos foram centrifugados a 15.000 rpm a 4°C por 45 minutos para a remoção do material insolúvel. Este material foi utilizado para a realização de immunoblotting, para a avaliação da expressão de proteínas da via de sinalização de leptina (ObRb, ObRb fosforilado em tirosina 985 e 1138, JAK2, JAK2 fosforilada, STAT3, STAT3 fosforilada, Akt, Akt fosforilada, MAPK, SOCS3 e PPTP1B).

O immunoblotting foi desenvolvido segundo o método descrito em 1970 (19). Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT 100mM e aquecidas em água fervente por 4 minutos. A seguir foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Tiveram como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A partir do extrato total de proteínas, 60 μ l de proteínas por amostra foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. Em todos os casos, o gel de poliacrilamida

foi balizado por marcador de peso molecular conhecido (BioRad). Eletroforese foi realizada em cuba de minigel da BioRad, com tampão de corrida. O SDS-PAGE foi submetido a 30 volts por 30 minutos e depois a 120 volts por mais 2 horas.

A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad, com tampão de transferência, mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas. Após a transferência as membranas foram incubadas em solução bloqueadora por 1 hora em temperatura ambiente e lavadas com solução basal por três sessões de dez minutos. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário específico para cada proteína estudada (ObRb, ObRb fosforilado em tirosina 985 e 1138, JAK2, JAK2 fosforilada, STAT3, STAT3 fosforilada, Akt, Akt fosforilada, MAPK 1 e 2, SOCS3 e PPTP1B). Os anticorpos foram importados da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA).

Após a incubação com o anticorpo, as membranas foram lavadas novamente com solução basal e então incubadas com anticorpo secundário para serem reveladas através de West Pico em fotodocumentadora.

Após a revelação e visualização das bandas, estas foram submetidas a densitometria óptica, utilizando o equipamento Un-Scan-It. Com estes dados foi realizada análise estatística comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos.

3.5 Soluções utilizadas:

- Tampão de extração para extrato total, para extração de proteínas ou

imunoprecipitação de tecidos. Contém: trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 a 1% e 0,1 mg/mL de aprotinina. Esta solução será mantida 4°C. O ortovanadato, PMSF e a aprotinina foram acrescentados no momento do uso.

- Tampão de Laemmli (5X), utilizado para estocar o material extraído e para sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese de sódio dodecil-sulfato (SDS-PAGE) a 6%. Contém: azul de bromofenol a 0,1%, fosfato de sódio a 1M pH 7,0, glicerol a 50%, SDS a 10%.
- Tampão de corrida (utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE): contém: trisma base a 200 mM, glicina a 1,52 M, EDTA a 7,18 mM, SDS a 0,4%. Solução estoque que diluída a 1:4 para uso.
- Tampão para transferência: utilizado para transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: trisma base a 25 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20% e SDS a 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular.
- Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contém: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, Tween 20 a 0,02%.
- Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém 5% de leite em pó desnatado (Molico) e azida sódica a 0,02%, dissolvidos em solução basal.
- Solução para anticorpos: solução na qual se diluem os anticorpos específicos.

Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica a 0,02%, diluídos em solução basal.

3.6 Modo de Análise dos Resultados

Valores foram expressos como média $\pm$ SEM (erro padrão) da diferença. Realizou-se Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ou Teste *t-Student*, de acordo com o experimento. Valores estatísticos significantes foram considerados quanto $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Obesidade induzida por dieta hiperlipídica leva à resistência às ações metabólicas da leptina

Para obtermos os efeitos da leptina na modulação do massa corporal, foram avaliados os dois parâmetros pelos quais a leptina exerce influência na redução do peso: a modulação do apetite e da termogênese. A leptina promoveu a redução do peso corporal de maneira diferente entre os animais obesos e os magros, apresentando uma menor atuação naqueles animais alimentados com DH. Antes do início do tratamento, a média do peso corporal dos animais RP e DH era de $413,2 \pm 43,6$ g e $495,5 \pm 57,8$ g, respectivamente. Depois do tratamento crônico ICV com leptina, os ratos alimentados com RP perderam $52,9 \pm 8,6$ g e os animais em dieta hiperlipídica não apresentaram perda substancial de massa corporal: $18,14 \pm 12,2$ g ($P < 0.05$ e $P = 0.6$, respectivamente) (fig.5-a).

Desta forma, houve uma redução do peso corporal de $12,8 \pm 2,3\%$ no grupo RP+leptina e $3,3 \pm 2,3\%$ no grupo DH+leptina ($P < 0.01$ e $P = 0.385$, respectivamente, comparado com seu controle salina) (fig.5-b). Conforme estes dados, a razão do peso do tecido adiposo epididimal sobre o peso corporal total foi também significativamente menor no grupo RP+leptina do que nos outros grupos, sendo RP+leptina: $0,27 \pm 0,1$, RP+salina: $0,62 \pm 0,4$, DH+leptina: $1,17 \pm 0,15$, DH+salina: $1,27 \pm 0,14$ ($P < 0,01$ para RP+leptina vs RP+salina) (fig.5-c).

A perda de massa dos animais possivelmente ocorreu devido à atuação da leptina no aumento da saciedade e do gasto energético. Com relação à modulação do apetite, a infusão crônica de leptina reduziu acentuadamente o consumo alimentar dos animais RP de $109,5 \pm 8,5$ para $57,3 \pm 7,0$ kcal/dia ($P < 0.0001$), mas o mesmo não ocorreu de maneira eficiente com o grupo DH+leptina: $104,1 \pm 6,7$ para $94,8 \pm 17,5$ kcal/dia (fig.5-d).

Para avaliar os efeitos da leptina na termogênese, o consumo de oxigênio (VO_2), a produção de dióxido de carbono (VCO_2) e o gasto energético foram analisados. Tanto o VO_2 , como o VCO_2 e o gasto energético de animais RP tratados com leptina, foram elevados com relação ao seu controle RP+Salina. Seguem os valores: VO_2 : RP+leptina: $14,46 \pm 0,1$ ml/min/kg^{0,75}, RP+salina: $11,56 \pm 0,15$ ml/min/kg^{0,75}; VCO_2 : RP+leptina: $11,89 \pm 0,08$ ml/min/kg^{0,75}, RP+salina: $9,86 \pm 0,12$ ml/min/kg^{0,75}; Gasto Energético: RP+leptina: $94,44 \pm 0,58$ kcal/dia/kg^{0,75}, RP+salina: $85,62 \pm 1,87$ kcal/dia/kg^{0,75} (todos $P < 0.0001$ para RP+leptina vs RP+salina). O grupo tratado com DH mostrou uma discreta diferença nesses parâmetros após o tratamento com leptina (fig.5-e, f e g).

A dieta hiperlipídica foi capaz de alterar alguns parâmetros termogênicos. O VO_2 , VCO_2 e o gasto energético dos animais controles tratados com DH foram maiores do que os animais RP+salina. VO_2 DH+salina: $13,07 \pm 0,11$ ml/min/kg^{0,75} VCO_2 DH+salina: $11,08 \pm 0,09$ ml/min/kg^{0,75} (ambos $p < 0.0001$ para RP+salina vs DH+salina) e Gasto Energético DH+salina $91,27 \pm 0,93$ kcal/dia/kg^{0,75} ($p < 0.005$ para RP+salina vs DH+salina).

Figura 5. Efeitos metabólicos da leptina

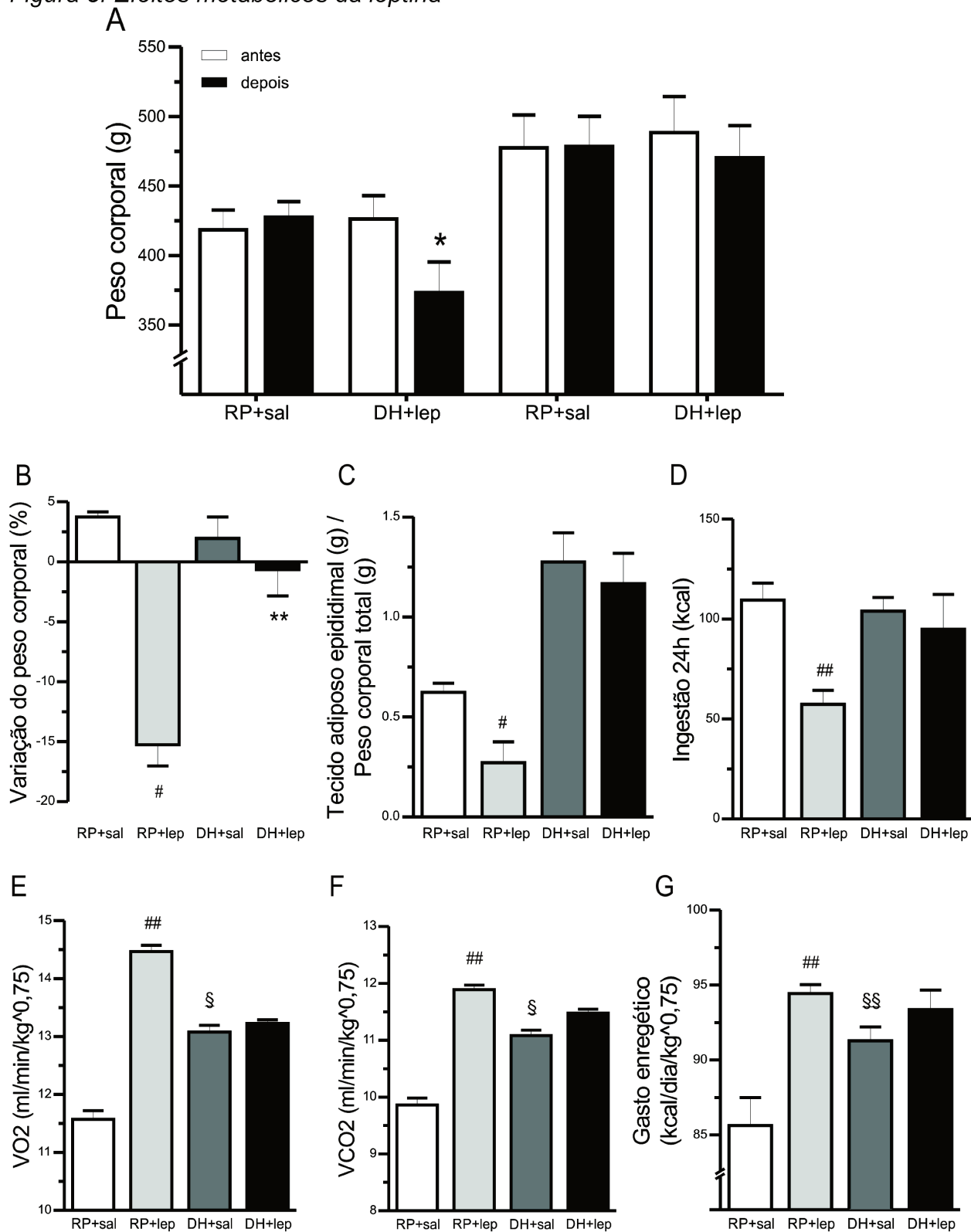


Figura 5. Peso corporal antes e depois do tratamento (g) (A), Variação de peso corporal (g) (B), Peso do tecido adiposo epididimal (g) / peso corporal total (g) (C), Ingestão alimentar (kcal) (D), Consumo de oxigênio (E), Produção de dióxido de carbono (F), Gasto energético (G) de ratos RP+leptina (n=7) ou salina (n=8) e DH+leptina (n=7) ou salina (n=7). Consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e gasto energético foram medidos em 6 animais de cada grupo. Barra de erro são EP indicando variância entre animais. *P<0.05 para cada animal antes vs depois do tratamento crônico. **P<0,05 RP+leptina vs DH+leptina. #P<0,01 e ###P<0,0001 para RP+leptina vs RP+salina. §P<0,001 e §§P<0,05 para RP+salina vs DH+salina.

4.2 Leptina promove alterações cardiovasculares tanto em animais magros como em obesos.

A infusão crônica ICV de leptina aumentou a média da pressão arterial (PAM) em ambos os grupos - RP e DH - de maneira similar, indicando que não houve interferência na ação do hormônio neste parâmetro. Em ratos RP, a MPA variou de 105.0±1.4 mmHg para 114.2±0.85 mmHg e em DH foi de 118.3±1.1 mmHg para 132.2±1.5 mmHg (ambos P<0,01) (fig.6-a).

Assim, houve uma variação de 10,44±0,12% em animais RP e 14,22±1,9% em animais DH, ambos tratados com leptina (P<0,01 e P<0,05 respectivamente). O tratamento com salina não causou tais alterações cardiovasculares (fig.6-b). No entanto, a dieta hiperlipídica foi capaz de promover um aumento na MPA para 118,25±1,06 mmHg (P<0,01).

Acompanhando as alterações ocorridas na pressão arterial, a Frequência Cardíaca (FC) apresentou um aumento significativo nos grupos RP e DH tratados com leptina (todos P<0.0001) (fig.6-c). A diferença na frequência cardíaca dos grupos

controles RP e DH também foi significativa ($P<0,0001$), indicando que a dieta rica em gorduras também promove aumento na frequência cardíaca.

Figura 6. Efeitos cardiovasculares da leptina

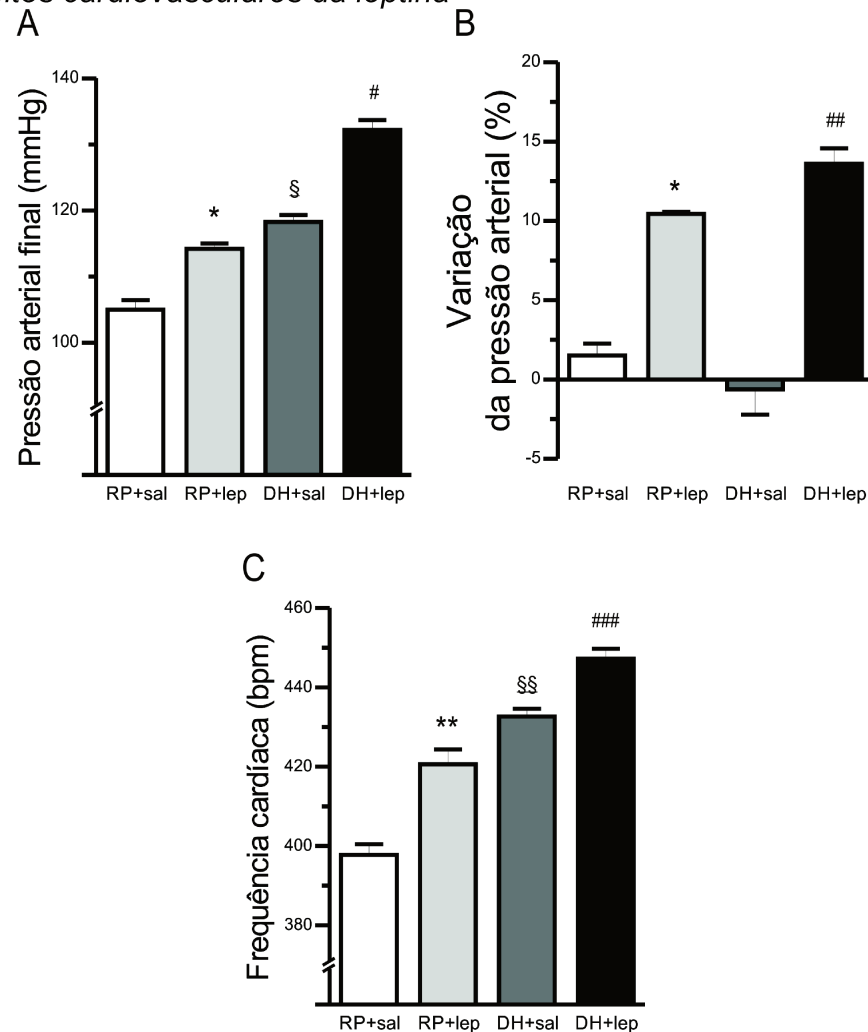


Figura 6. MPA após tratamento (A), Variação da PAS (B), Frequência cardíaca (C). RP+leptina (n=7), RP+salina (n=8), DH+leptina (n=7) e DH+salina (n=7). Barras de erro são EP indicando variância entre animais. * $P<0,01$, ** $P<0,001$ para RP+salina vs DH+leptina. # $P<0,01$, ## $P<0,05$, ### $P<0,0001$ para DH+leptina vs DH+salina. § $P<0,01$ e §§ $P<0,0001$ para RP+salina vs DH+salina.

4.3 A via de sinalização hipotalâmica de leptina é ativada de maneira diferente em animais magros e obesos.

Com o objetivo de confirmar que não houve extravasamento através da barreira hemato-encefálica da leptina injetada ICV para a circulação periférica, os níveis de séricos de leptina foram medidos e não foi detectado nenhum aumento nos níveis plasmáticos de leptina nos animais tratados via ICV (fig. 7-a). Indicando que o hormônio permaneceu no fluido intersticial cerebral dos animais.

Para avaliar e comparar os efeitos crônicos centrais da leptina em animais magros e obesos, algumas proteínas relacionadas às vias hipotalâmicas foram analisadas. Foi detectado um aumento significativo na expressão das proteínas inibitórias SOCS3 e PTP1B no grupo DH. Esse aumento foi mais acentuado no grupo DH tratado com leptina (fig.7-b,c).

A fosforilação de Jak2 é necessária para a ativação das três vias de sinalização da leptina, pois o receptor ObRb é dependente desta proteína. No grupo DH+leptina a Jak2 foi diminuída quando comparada com RP+leptina (fig.7-d). De maneira semelhante, houve redução da fosforilação das proteínas Akt e Stat3 nos grupos DH (fig 7-e,f).

Após o estímulo com leptina, o receptor ObRb pode ser fosforilado em dois sítios de tirosinas, as quais levam à ativação de diferentes vias que acarretam diferentes efeitos fisiológicos. A fosforilação de ObRb em tirosina 1138 foi reduzida em animais DH+leptina em comparação com RP+leptina (fig.7-g). Entretanto, a fosforilação de ObRb em tirosina 985 foi similar nos grupos DH e RP tratados com leptina (fig.7-h). ObRb quando fosforilado em tirosina 985 promove a ativação da proteína MAPK e

demais proteínas relacionadas a esta via. Observamos que a expressão de MAPK, assim como de ObRb em tirosina 985 estão aumentadas tanto em ratos obesos como em magros, ambos tratados com leptina (fig. 7-i)

Figura 7. Sinalização hipotalâmica de leptina.

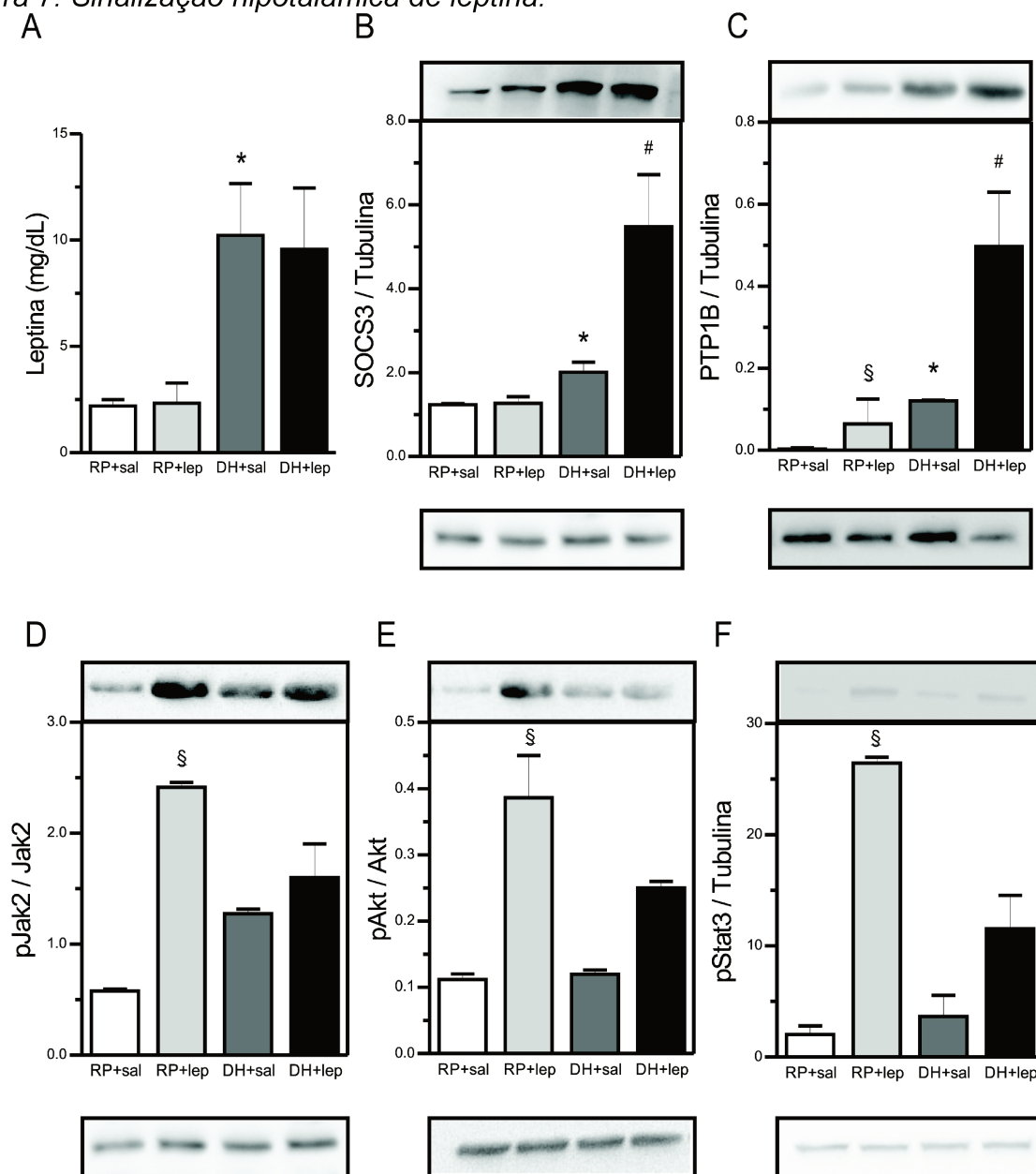


Figura 7 (continuação). Sinalização hipotalâmica de leptina.

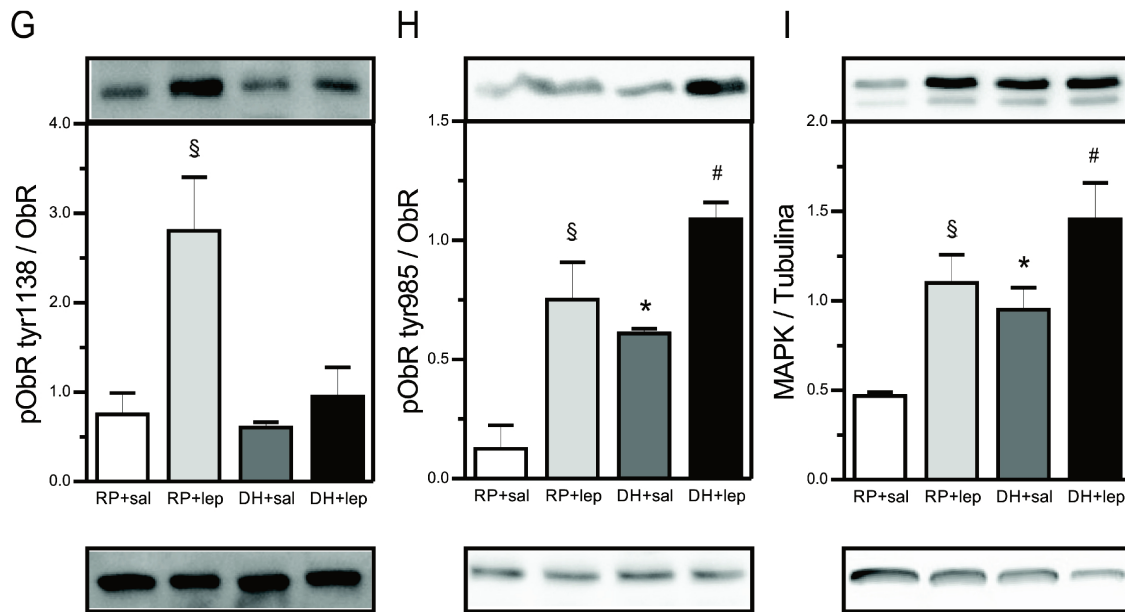


Figura 7. Concentração plasmática de leptina (A), Imagens representativas de Western Blot de proteínas da via de sinalização da leptina no hipotálamo: SOCS3 (B), PTP1B (C), phospho-Jak2 / Jak2 (D), phospho-Akt / Akt (E), phospho-Stat3 (F), phospho-ObR_{tyrosine1138} (G), phospho-ObR_{tyrosine985}, e MAPK (I). Dados são apresentados como média $\pm$ SEM de 7 - 8 animais por grupo. * $P < 0.05$ para RP+saliva vs DH+salina. # $P < 0.05$ para DH+salina vs DH+leptina. § $P < 0.05$ para RP+salina vs RP+leptina.

5. DISCUSSÃO

Os altos níveis séricos de leptina, observados na obesidade, são frequentemente associados à resistência aos efeitos anorexigênicos e termogênicos deste hormônio. No entanto, o mecanismo de manutenção da homeostase energética ainda não está claro e são necessárias mais pesquisas para seu melhor entendimento.

Os resultados obtidos neste trabalho se mostram relevantes neste sentido. O fato de animais obesos apresentarem uma discreta redução na massa corporal em relação aos magros, confirma as informações amplamente encontradas na literatura (28, 30), que mostram que indivíduos obesos são resistentes às ações metabólicas da leptina (27).

Os ratos magros foram mais afetados pelo tratamento crônico com leptina e tiveram uma significativa redução no consumo alimentar. Além disso, o tratamento promoveu o aumento do gasto energético apenas nos animais magros. Dessa maneira, foi possível observar nesse modelo experimental a existência da resistência às ações metabólicas da leptina. Esse fenômeno foi primeiramente observado por Frederich e cols. (1995) um ano após a descoberta da leptina. Eles mostraram que uma dieta rica em gorduras limitava os seus efeitos na redução de peso (27).

Em 2000, Aizaia-Abe ampliou esse paradoxo e levou os pesquisadores a introduzirem o novo conceito de Resistência Seletiva à Leptina (28). A questão seria: como a hiperleptinemia contribui para o aumento da PAS, se o animal em obesidade induzida por DH é resistente à leptina? É possível se fazer uma analogia com a

resistência à insulina, que também ocorre de maneira seletiva e não-uniforme (29). Com base nessa analogia, é possível se chegar a um consenso de que, em algumas formas de obesidade, pode haver resistência às ações metabólicas da leptina com preservação de sua capacidade de modulação do SNS e outros sistemas que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão.

No presente estudo, a aferição da pressão arterial foi feita de maneira não invasiva em animais acordados por um equipamento gentilmente cedido pela professora Fernanda Klein (FOP - Unicamp). A PAS dos animais foi aferida antes e após o tratamento crônico, dessa maneira foi possível obter a variação da pressão em cada animal.

Já na primeira aferição, pôde-se observar que os animais obesos tiveram a PAS aumentada em relação aos magros. Esse resultado reforça que há uma relação linear entre IMC e PAS (13). Na aferição final, tanto os animais magros como os obesos tratados com leptina, tiveram aumento significativo na pressão arterial, indicando que os animais obesos também foram afetados pela leptina em seu efeito na modulação da PAS, este fato mostra que, neste caso, não houve resistência às suas ações.

Vários estudos demonstram que leptina promove um aumento na atividade do NSR em obesos (5, 6, 14, 16, 15, 23). O estudo de Rahmouni (2005) (30), que também utilizou ratos Sprague Dawley, mostrou que a ativação simpática direcionada ao TAM foi diminuída em animais obesos. Sendo assim, é possível afirmar que a leptina possui ações distintas no SNC, sendo que o estímulo do SNS para a promoção da termogênese faz parte da resposta metabólica da leptina, já o estímulo do NSR faz parte da sua resposta cardiovascular. Esses dois efeitos (metabólico e cardiovascular)

podem ser modulados por diferentes mecanismos. A questão seria: de que maneira ocorre a diferenciação da ação da leptina no SNS?

Apesar de muitos estudos mencionarem a RSL, ainda não está claro quais são os mecanismos responsáveis pelas alterações metabólicas e cardiovasculares promovidas pela leptina na condição de obesidade.

A resistência à leptina na obesidade é, em partes, atribuída à saturação parcial da barreira hemato-encefálica (31). Entretanto, neste trabalho o hormônio foi injetado no terceiro ventrículo, onde entrou em contato direto com o hipotálamo através do líquido intersticial, eliminando o viés da redução do transporte através da barreira hemato-encefálica. Além disso, por meio da quantificação dos níveis séricos de leptina, foi comprovado que a substância administrada via ICV não extravasou para a corrente sanguínea e permaneceu no SNC, eliminando, assim, a possibilidade de seus efeitos serem atribuídos à sua ação periférica. Portanto, todos os efeitos fisiológicos da leptina estão relacionados à sua atuação no SNC. Dadas estas informações, as vias de sinalização hipotalâmicas mostram-se relevantes para desenvolvimento da RSL.

Existem evidências de que a resposta do SNS é mediada pelo receptor ObRb hipotalâmico. Em ratos Zucker e em camundongos db/db, com perda de função do ObRb, a resposta do SNS foi ausente (32, 33). Metlakunta e cols. (2008) demonstraram que a proteína inibidora SOCS3 modula as vias PI3K e Stat3. Eles observaram que a via PI3K é prejudicada em obesidade induzida por DH (34, 35). Esses resultados foram reproduzidos no presente trabalho: além da SOCS3, a proteína inibidora PTP1B também foi aumentada na condição de obesidade. Semelhantemente, as fosforilação de Akt (estimulada pela via PI3K), e de Stat3 foram reduzidas nos animais obesos.

Quando a leptina se liga ao receptor ObRb, o mesmo é fosforilado em dois diferentes resíduos de tirosina: a tirosina 985 e a 1138. A fosforilação de ObRb em tirosina 1138, precursora da Stat3, foi diminuída nos animais alimentados com DH.

Entretanto, a fosforilação de ObRb em tirosina 985 e a consequente ativação da via da MAPK, não sofreu alteração no grupo DH, indicando que essa via pode exercer alguma influência no aumento da PAS.

Diversos estudos levam em consideração a ação sítio-específica da leptina (10, 11). Em contraste com os resultados obtidos neste trabalho, Keung e cols. apontam que, em obesos, a redução da sinalização da leptina ocorre apenas no Núcleo Arqueado, e os demais núcleos hipotalâmicos permanecem sensíveis (25). Com apenas 6 dias em DH, o Núcleo Arqueado se mostrou resistente à leptina, o mesmo não foi observado nos demais núcleos hipotalâmicos (32). A análise individual de cada núcleo hipotalâmico poderia fornecer uma visão mais detalhada sobre atuação da leptina e sua sinalização no Sistema Nervoso Central. Porém, com os resultados aqui apresentados, é possível inferir que as alterações fisiológicas observadas na obesidade possuem origem molecular. Mais especificamente, há uma redução da ativação das vias hipotalâmicas ObRb_{tyr1138} / Stat3 e Jak2 / PI3K / Akt, com preservação da atividade da via ObRb_{tyr985} / MAPK.

A relação entre hiperleptinemia e o desenvolvimento e progressão de alterações morfológicas nos rins em pacientes obesos devem ser discutidos. Para os próximos passos deste estudo, será analisada a influência da leptina sobre o NSR e os rins, associando esses dados com a atividade molecular dos núcleos hipotalâmicos.

Um importante alvo de pesquisa que necessita ser melhor esclarecido, é a

relação entre o consumo de dietas ricas em gorduras (principalmente as saturadas) e a inflamação crônica subclínica que os indivíduos obesos apresentam. Alguns estudos demonstram que esses fatores são de crucial importância para o desenvolvimento da resistência à leptina, bem como de outros hormônios como a insulina.

Estudos demonstram que o consumo de dietas ricas em gorduras pode ativar respostas inflamatórias no hipotálamo, levando a distúrbios nos sinais anorexigênicos e termogênicos gerados pela leptina, prejudicando o controle do peso corporal (48). Por outro lado, o estudo de Prior e cols. (2011) mostrou que a dieta hiperlipídica acentuou o aumento da atividade do NSR promovido pela leptina ICV, já os efeitos metabólicos da leptina foram diminuídos nesses animais (49). Esses dados reforçam que a dieta hiperlipídica pode ser um dos elementos que participam da gênese da RSL em humanos.

6.CONCLUSÃO

A ação central da leptina leva a diferentes alterações fisiológicas periféricas, tais como a modulação da termogênese e regulação da pressão arterial. Os mecanismos moleculares pelos quais este hormônio atua ainda não são totalmente claros. Entretanto, pôde-se observar que na obesidade existe uma alteração nas vias de sinalização hipotalâmicas da leptina, mediadas pela ativação do seu receptor ObRb. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que a via hipotalâmica mediada pela fosforilação de ObRb em tirosina 985 possui uma associação com o aumento da PAS.

Os efeitos da infusão ICV de leptina sobre nervo simpático renal e os rins serão alvo de investigação nos próximos estudos. Bem como a análise do papel da DH e da inflamação no desenvolvimento da RSL.

Além disso, os mecanismos moleculares hipotalâmicos pelos quais ocorre diferenciação na sinalização de leptina na obesidade ainda não estão claros e serão e necessitam ser melhor esclarecidos.

7.REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO, fact sheet nº311, 2013
2. Vigitel, Ministério da Saúde - Brasil, 2012
3. Gortmaker SL, Swinburn BA, Levy D, Carter R, Mabry PL, Finegood DT, Huang T, Marsh T, Moodie ML. Changing the future of obesity: science, policy, and action. *Lancet*. 2011. 378: 838–47.
4. Levy RL, White PD, Stroud WD, Hillman CC. Its Prognostic Significance in Relation to Hypertension and Cardiovascular-Renal Diseases. *Journal of American Medical Association*. 1946. 131(12):951-953
5. Rahmouni K, Correia MLG, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms *Hypertension* 2005, 45:9-14.
6. Chen W, Leo S, Weng C, Yang X, Wu Y, Tang X. Mechanisms mediating renal sympathetic nerve activation in obesity-related hypertension. *Cardiovascular Diseases - Herz*. 2014. 01-03.
7. Esler MD, Eikelis N, Lambert E, Straznicki N. Neural mechanisms and management of obesity-related hypertension. *Current Cardiology Reports*. 2008. 10:456–463
8. Cottrell EC, Mercer JG. Leptin receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2012. 209:3-21.
9. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. 2009. 297:E1247-E1259.

- 10.** Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. 1994. *Nature* 372, 425 – 432.
- 11.** Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996. 38(6588): 250-252.
- 12.** Velloso LA. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese – Implicações no desenvolvimento da obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*. 2006. 50(2): 165-76.
- 13.** Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*. 1995. (1) 1311 - 1314.
- 14.** Hall JE, da Silva AA, do Carmo JM, Dubinon J, Hamza S, Munusamy S, Smith G, Stec DE. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285;23:17271-76.
- 15.** Ozata M, Ozdemir IC, Licino J. Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects. 1999. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol 84 Issue 10.
- 16.** Mark AL. Selective leptin resistance revisited. *American Journal of Physiology*. 2013. Vol. 305no. R566-R581.

- 17.** Correia MLG, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The Concept of Selective Leptin Resistance - Evidence From Agouti Yellow Obese Mice. *Diabetes*. 2002. vol. 51 no. 2 439-442.
- 18.** do Carmo JM, da Silva AA, Cai Z, Lin S, Dubinon JH, Hall JE. Control of blood pressure, appetite, and glucose by leptin in mice lacking leptin receptors in proopiomelanocortin neurons. *Hypertension*. 2013. 57(5):918-26.
- 19.** Harlan S, Guo DF, Morgan DA, Fernandes-Santos C, Rahmouni K. Hypothalamic mTORC1 signaling controls sympathetic nerve activity and arterial pressure and mediates leptin effects. *Cell Metab*. 17: 599– 606, 2013.
- 20.** Haynes WG. Role of leptin in obesity-related hypertension. *Experimental Physiology*. 2005. 90(5):683–88.
- 21.** Millington GWM. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition & Metabolism* 2007. 4:18
- 22.** Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000. 404:661-671.
- 23.** Kuo JJ, Silva AA, Hall JE. Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function . *Hypertension*. 2003. 41:768-774.
- 24.** do Carmo JM, da Silva AA, Rushing JS, Hall JE. Activation of the central melanocortin system contributes to the increased arterial pressure in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2012. 302(5):R561-7.
- 25.** Paxinos, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 1944.
- 26.** Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J,

Velloso LA, Carneiro E, Carvalheira JB, Curi R, Saad MJ. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia*. 2007. 50:1949-59.

27. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann C, Lowel BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*. 1995. 1 (12).

28. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *Journal of Clinical Investigation*. 2000. 105: 1243–1252.

29. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metabolism*. 2008. 7: 95–96.

30. Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes*. 2005. 54: 2012–2018.

31. Morgan DA, Thedens DR, Weiss R, Rahmouni K. Mechanisms mediating renal sympathetic activation to leptin in obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008. 295: R1730 –R1736.

32. Harlan SM, Rahmouni K. Neuroanatomical determinants of the sympathetic nerve responses evoked by leptin. *Clin Auton Res*. 2013. 23:1-7.

33. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *JCI*. 1997. 100: 270-278.

34. Metlakunta AS, Sahu M, Sahu A. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase pathway of leptin signaling is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. *Endocrinology*. 2008 149: 1121–1128.

- 35.** Metlakunta AS, Sahu M, Yasukawa H, Dhillon SS, Belsham DD, Yoshimura A, Sahu A. Neuronal suppressor of cytokine signaling-3 deficiency enhances hypothalamic leptin-dependent phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011. 300: R1185–R1193.
- 36.** Munzberg H. Differential leptin access into the brain—a hierarchical organization of hypothalamic leptin target sites? *Physiol Behav*. 2008 94: 664 –669.
- 37.** Matarazzo V, Schaller F, Nédélec E, Benani A, Pénicaud L, Muscatelli F, Moyse E, Bauer S. Inactivation of Socs3 in the hypothalamus enhances the hindbrain response to endogenous satiety signals via oxytocin signaling. *J Neurosci*. 2012. Nov 28;32(48).
- 38.** Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*. 1996. 387, 113-116.
- 39.** Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995. 80, 213-223.
- 40.** Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up- regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev*. 1997. 11, 593-602.
- 41.** White CL, Whittington A, Barner MJ, Wang Z, Bray GA, Morrison CD. HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009. Feb;296(2).
- 42.** Reseland JE, Anderssen SA, Solvoll K, Hjermann I, Urdal P, Holme I, Drevon CA.

Effect of long-term changes in diet and exercise on plasma leptin concentrations. The American Journal of Clinical Nutrition. 2001. vol. 73 no. 2 240-245.

43. Friedmann JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998; 395(22):763-70.

44. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature. 2000. Apr 6;404(6778):661-71.

45. Kievit, P., Howard, J. K., Badman, M. K., Balthasar, N., Coppari, R., Mori, H., Lee, C. E., Elmquist, J. K., Yoshimura, A., and Flier, J. S. (2006). Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. Cell Metab 4, 123-132.

46. Bence, K. K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C. Z., Hotamisligil, G. S., Neel, B. G., and Kahn, B. B. (2006). Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. Nat Med 12, 917-924.

47. Bouret SG. Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain. Endocrinology. 2008. Mar;149(3):875-6.

48. Dong M, Ren J. What fans the fire: insights into mechanisms of leptin in metabolic syndrome- associated heart diseases. Curr Pharm Des. 2014. 20(4):652-8.

49. Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. Neuroimmunomodulation. 2008. 15(3):189-93

50. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers Jr. MG. Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor. The Journal of Biological Chemistry. 2000. 275,14563-14572.

51. Vlassopoulos A, Combet E, Lean MEJ. Changing distributions of body size and

adiposity with age. International Journal of Obesity. 2013. 1-8