

***ÉRICA PENTEADO***

**Tratamento com topiramato melhora a  
sensibilidade hipotalâmica à insulina em  
camundongos obesos**

**CAMPINAS**

**2011**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Tratamento com topiramato melhora a sensibilidade  
hipotalâmica à insulina em camundongos obesos**

**Érica Penteado**

*Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Mestre em Clínica Médica, área de concentração em  
ciências básicas. Sob a orientação da Profa. Dra.  
Patrícia Oliveira Prada.*

**Campinas, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P387t Penteadó, Érica, 1973 -  
Tratamento com topiramato melhora a  
sensibilidade hipotalâmica à insulina em  
camundongos obesos. / Érica Penteadó. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Patrícia de Oliveira Prada  
Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências  
Médicas.

1. Insulina. 2. Hipotálamo. 3. Metabolismo  
energético. 4. Ingestão de alimentos. 5.  
Obesidade. I. Prada, Patrícia de Oliveira. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Topiramate improves insulin signalling the hypothalamus of mice on high-fat diet

**Palavra-chave em inglês:**

Insulin

Hypothalamus

Energy metabolism

Eating

Obesity

**Área de Concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Mestre em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Patricia de Oliveira Prada [Orientador]

Maria Helena Melo Lima

Paty Karoll Picardi

**Data da defesa:** 18-11-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
Érica Penteado

---

---

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia de Oliveira Prada

---

---

**Membros:**

---

1. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia de Oliveira Prada

*Patrícia de Oliveira Prada*

---

2. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Helena Melo Lima

*Maria Helena S. Lima*

---

3. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paty Karoll Picardi

*P. Picardi*

---

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

---

Data: 18/11/2011

---

## ***SUMÁRIO***

---

<b>RESUMO .....</b>	<b>07</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1. Diabetes Mellitus Tipo 2.....	15
1.2. Obesidade e resistência a insulina.....	17
1.3 Topiramato.....	22
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Anticorpos, reagentes químicos e materiais.....	28
3.2. Soluções utilizadas.....	28
3.3. Animais e grupos experimentais.....	30
3.4. Canulação de ventrículo lateral.....	31
3.5. Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação .....	32
3.6. Determinação da posologia.....	33
3.7. Estudo da regulação do gasto energético.....	33
3.8. Apresentação dos Dados e Análise Estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>51</b>

---

***RESUMO***

O topiramato (TPM) é utilizado atualmente no tratamento da epilepsia e da enxaqueca por ser antagonista do receptor AMPA/KA e por aumentar o receptor de GABA, desencadeando a estabilização dos canais de sódio e cálcio. O efeito colateral mais conhecido dessa droga é a perda de peso, o aumento do gasto energético e da termogênese. Os hormônios anorexigênicos insulina e leptina regulam a atividade de populações distintas de neurônios que controlam o balanço energético via ativação da via IR/PI3K/Akt e OBR/JAK2/STAT3 respectivamente. Entretanto, desconhece-se se o efeito do TPM na perda de peso é decorrente de alterações da ação insulínica ou de leptina no hipotálamo. Assim, o objetivo do estudo é investigar se o tratamento com essa droga altera a sinalização da insulina e da leptina em hipotálamo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (DH) ou ração padrão. Camundongos Swiss obesos ou com dieta padrão foram submetidos à cirurgia estereotáxica para inserção de cânula no ventrículo lateral. Após uma semana de recuperação, as cânulas foram testadas, e os animais foram tratados com 110mg/kg/dia de TPM, via gavagem, por sete dias, tendo sua ingestão alimentar e peso corpóreo monitorados diariamente. Observou-se que os animais em DH, tratados com TPM, possuem um menor ganho de peso e de ingestão alimentar do que seus controles, tratados com veículo. Não houve, porém, diferença quanto ao ganho de peso e ingestão alimentar dos animais tratados com a droga não obesos. Observou-se um aumento da termogênese nos animais obesos tratados com TPM pelo aumento da expressão da proteína UCP1, proteína desacopladora mitocondrial do tecido adiposo marrom, e também pelo aumento do consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>, marcadores de termogênese. A nível molecular, os animais obesos apresentaram redução da fosforilação do receptor de insulina, IRS-1 e Akt induzidos por insulina e redução da fosforilação de OBR/JAK2/STAT3 induzida por leptina em hipotálamo. Entretanto, o tratamento com TPM reverteu este efeito, sugerindo que o tratamento com a droga induz uma melhora da ação/sinalização insulínica e de leptina no hipotálamo de camundongos obesos. Dessa maneira, sugere-se que o tratamento com TPM, pelo menos a curto prazo, melhora da ação e sinalização da insulina e leptina em hipotálamo, podendo ser um dos mecanismos pelos quais ocorre redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético nesses animais. Essa alteração de ingestão e de termogênese pode contribuir para a redução da adiposidade de camundongos obesos tratados com topiramato. Assim, essa droga parece ter um potencial terapêutico no tratamento da obesidade e da resistência à insulina.

**Palavras-chaves: insulina, hipotálamo, metabolismo energético, ingestão de alimentos, obesidade**

---

***ABSTRACT***

Topiramate (TPM) is an anticonvulsant drug used for the treatment of epilepsy and prophylaxis of migraine. Weight loss is a frequently side effect reported in patients and animal models treated with TPM. In animal models topiramate may increase levels of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH), which is an anorexigenic neuropeptide and may decrease food intake. Some studies showed that topiramate may decrease energy storage, and thus increase energy expenditure and thermogenesis. However, the mechanisms by which TPM reduces body weight are not completely known so far. The hypothalamus is acknowledged as an important regulator of whole-body energy homeostasis by integrating nutrient and hormones signals from central and peripheral inputs. Anorexigenic hormones such as insulin and leptin regulate the activity of distinct neuron populations that control energy balance via IR/PI3K/Akt/Foxo1 pathway or OBR/JAK2/STAT3 pathway respectively. However, if topiramate alters hypothalamic insulin or leptin sensitivity is not known. Thus, in the present study, we asked whether topiramate treatment alters energy balance by altering insulin and leptin action/signaling in the hypothalamus from control and diet-induced obesity (DIO) mice. Our data provide evidence that short treatment with topiramate improves hypothalamic insulin and leptin signaling and action in obese mice. The improvement of hypothalamic insulin and leptin may reduce food ingestion and increase energy expenditure by increases in CRH and TRH mRNA expression. The lower food intake and higher energy expenditure induced by topiramate treatment may reduce obesity in mice on high fat feeding and may be an alternative therapy for obese treatment.

**KEY WORDS: insulin, hypothalamus, energy metabolism, food intake, obesity.**

---

***ABREVIATURAS***

Akt – Proteína quinase B/Akt

AMPK- Proteína quinase ativada por AMP

ATP- Adenosina trifosfato

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

IR $\beta$  (Insulin Receptor  $\beta$ )– Subunidade  $\beta$  do receptor de insulina

IRS 1/2 (Insulin Receptor Substrate 1/2) – Substratos 1 e 2 do receptor de insulina

ITT- Teste de tolerância à insulina

TPM- topiramato

MAPK- Proteína quinase ativadora de mitose

Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Pirofosfato de sódio

*ob/ob* – Camundongo obeso com mutação no gene da leptina

PI-3 quinase – Fosfatidil-inositol 3 quinase

PTP 1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1 B) – Proteína tirosina fosfatase 1B

TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) – Fator de necrose Tumoral  $\alpha$

ICV - Intracerebroventricular

---

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- Diabetes Mellitus Tipo 2.

O Diabetes Mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, resultando em resistência insulínica.

Desde a descoberta da insulina em 1921, muitos estudiosos têm se dedicado ao entendimento do mecanismo molecular de ação deste hormônio. A importância do estudo da ação da insulina é dada pela prevalência da resistência à insulina, presente na patogenia de diversas doenças como obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2 e associada a outras enfermidades endócrinas como hipercortisolismo e acromegalia<sup>1</sup>.

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células  $\alpha$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica.

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2 sub-unidades alfa e duas subunidades beta, unidas por ligações dissulfeto<sup>2</sup>. A sub-unidade alfa é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A sub-unidade beta é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase<sup>3</sup>. A insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos incluindo a cascata de reações de fosforilação e desfosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento<sup>4,5,6</sup>.

O primeiro substrato protéico descrito recebeu o nome de substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1<sup>4</sup>. O DNA complementar (cDNA) do IRS-1 prevê uma proteína de 1235 aminoácidos, sendo inicialmente denominada pp185 por sua mobilidade eletroforética. Posteriormente, foi observado que uma outra proteína de 190 kDa, identificada como IRS-2, é rapidamente fosforilada nos grupos tirosina em resposta à insulina<sup>7</sup>. Estas proteínas são de localização citoplasmática e apresenta sítios de fosforilação em resíduos tirosina com a seqüência repetida YMXM ou YXXM, onde Y é tirosina, M é metionina, e X é qualquer aminoácido. A fosforilação da tirosina permite sua associação a proteínas que possuem domínios SH2 e SH3 de reconhecimento específico para fosfotirosina<sup>5,6,8</sup>.

Desta forma, as proteínas IRS-1/2 desempenham função essencial na transmissão do sinal insulínico e a fosforilação desses substratos permite a interação com diversas proteínas adaptadoras ou com atividade enzimática, caracterizando o efeito pleiotrópico da insulina.

Há uma estreita associação entre a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) com IRS-1/2 após estimulação com insulina<sup>9</sup>. A PI 3-quinase é uma enzima que contém dois sítios SH2 e um SH3<sup>10</sup> e é a mais bem estudada molécula sinalizadora ativada pela IRS-1. É uma serina/treonina quinase e tem um papel importante em muitos processos celulares, incluindo proliferação celular e captação de glicose. A molécula do IRS-1, quando fosforilada em tirosina, permite a sua associação ao domínio SH2 da sub-unidade regulatória da PI 3-quinase, levando à ativação desta enzima<sup>11</sup>. Esta enzima catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (PI), do fosfatidil-inositol-4-fosfato (PI-4P) e do fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PI-4,5P2), resultando na estimulação do transporte de glicose<sup>8,11</sup>.

Algumas proteínas, como a p70S6K e AKT (proteína quinase B/PKB) são ativadas pela via ligada a PI 3-quinase<sup>12,13</sup> e têm um papel importante na regulação da expressão de genes e no crescimento celular em resposta a inúmeros estímulos<sup>14</sup>.

A ação insulínica pode ser afetada de maneiras diferentes por estados fisiológicos ou fatores circulantes. A secreção ou administração em excesso de glicocorticóides, glucagon, catecolaminas e hormônio de crescimento induz resistência à insulina, presente tanto em humanos quanto em animais. Condições fisiológicas como a gestação e o "envelhecimento"

também apresentam resistência à insulina. Com o uso de anticorpos específicos anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PI 3-quinase e antifosfotirosina, demonstrou-se, em células em cultura e em tecidos animais, que a resistência à insulina pode estar associada a alterações nas primeiras etapas da ação insulínica após a ligação do hormônio ao seu receptor<sup>15,16,17,18,19,20</sup>.

## **1.2- Obesidade e resistência a insulina.**

O receptor de insulina (IR), além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina. Essa fosforilação inibitória causa *feedback* negativo na sinalização insulínica e pode provocar resistência à insulina. Alguns estudos indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser decorrente da ativação sequencial de isoformas específicas da proteína quinase C (PKC) e da quinase inibidora do fator nuclear  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)<sup>21,22</sup>.

A ação da insulina também é atenuada por proteínas fosfatases de tirosina, que catalisam a rápida desfosforilação do IR e de seus substratos. Várias proteínas fosfatases de tirosina foram identificadas, dentre as quais, destaca-se a PTP1B. Camundongos *knockout* para PTP1B têm aumento da fosforilação em tirosina do IR e das proteínas IRS no músculo; conseqüentemente, apresentam aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, camundongos PTP1B<sup>-/-</sup> também são resistentes à obesidade induzida por dieta, implicando a PTP1B como alvo terapêutico potencial no diabetes e obesidade<sup>23</sup>.

A resistência à insulina da obesidade e do diabetes tipo 2 é caracterizada por alterações em diversos pontos da via de transmissão do sinal da insulina, além da redução da concentração e da atividade quinase do IR. Também é descrito redução da concentração e da fosforilação do IRS-1 e -2, da atividade da PI-3q, da translocação dos transportadores de glicose e da atividade das enzimas intracelulares. Isso pode ocorrer em paralelo à manutenção da ativação normal da via mitogênica, representada pela MAP quinase<sup>21,22</sup>.

Fatores genéticos e adquiridos podem influenciar a sensibilidade à insulina. Defeitos genéticos no IR são relativamente raros, mas representam as formas mais graves de resistência à insulina, e são exemplificados pelo leprechaunismo, pela síndrome de Rabson Mendenhall e pela síndrome de resistência à insulina tipo A. Diferenças na apresentação

clínica podem ser decorrentes da gravidade do defeito genético, da capacidade dos receptores mutantes de formar híbridos com outros receptores (por exemplo, o de IGF-1), e outros fatores de base, genéticos e adquiridos, que modificam o estado de resistência à insulina. A síndrome de resistência à insulina e o diabetes tipo 2 são poligênicos e podem envolver polimorfismos em vários genes que codificam as proteínas envolvidas nas vias de sinalização da insulina, na secreção de insulina e no metabolismo intermediário. Deleções selecionadas de componentes da sinalização de insulina *in vivo* usando recombinação homóloga permitiram novas interpretações sobre a complexidade destes mecanismos. Embora alguns defeitos únicos na via de sinalização da insulina possam resultar em diabetes (*knockout* do IR, do IRS-2 ou da Akt2), outros não (*knockout* da subunidade p85 da PI-3q, do IRS-1 e do GLUT4). Além disso, *knockout* de genes que estão envolvidos em “desligar” o sinal de insulina, como a PTP1B e a SHIP2, melhoram o diabetes em roedores obesos<sup>22</sup>.

Combinações de *knockouts* foram produzidas para mimetizar o diabetes tipo 2 poligênico, com deleções heterozigotas do IR e do IRS-1; do IR, do IRS-1 e do IRS-2; e do IRS-1 e da glicocinase. Em algumas dessas combinações houve clara evidência de *epistasia* genética (interação gene gene). Por exemplo, embora o *knockout* heterozigoto do IR ou do IRS-1 isolados não resultem em diabetes, o *knockout* duplo-heterozigoto leva 50% dos camundongos a desenvolver diabetes. Este achado marcante propiciou novas possibilidades etiopatogênicas para o diabetes tipo 2, no qual alterações únicas na expressão do IR ou do IRS-1 geram alterações modestas na capacidade de transmissão intracelular do sinal, mas quando combinadas podem levar à doença<sup>22</sup>.

Um modelo genético que produziu um fenótipo intrigante com relação à homeostase de glicose surgiu a partir dos *knockouts* das subunidades regulatórias p85 $\alpha$  da PI-3q. Embora a PI-3q seja central nas ações metabólicas da insulina, o camundongo *knockout* heterozigoto para a p85 $\alpha$  exibe aumento da sensibilidade à insulina. Além disso, quando essa mutação é produzida em conjunto com o duplo *knockout* heterozigoto IR/IRS-1, ela protege contra o diabetes. Esta surpreendente proteção parece ser decorrente de um fator único na via de sinalização da insulina, na qual o balanço estequiométrico entre a p85 $\alpha$ , a subunidade catalítica p110 e as proteínas IRS é crítico para a transmissão do sinal<sup>22</sup>.

A participação de tecidos específicos na patogênese da resistência à insulina e do diabetes tipo 2 tem sido explorada usando a tecnologia de recombinação de DNA *Cre-lox* para criar

*knockouts* tecido-específicos do IR e do GLUT4. Apesar da ausência de diabetes em camundongos *knockout* global de GLUT4, os animais *knockout* tecido-específicos do GLUT4 no músculo e tecido adiposo resultaram em diminuição acentuada da tolerância à glicose. Os animais *knockout* tecido-específicos do IR também produziram resultados interessantes. Como observado acima, apesar do conhecimento prévio de que a insulina estimula a captação de glicose primariamente no músculo, camundongos *knockout* para o IR no músculo apresentam tolerância à glicose normal. Isto ocorre, ao menos parcialmente, como resultado do redirecionamento da captação de glicose para a gordura, com subsequente aumento na massa de tecido adiposo, ácidos graxos livres circulantes e triglicérides. Camundongos *knockout* adiposo-específico do IR também apresentam tolerância à glicose normal, enquanto o *knockout* fígado-específico do IR apresenta diminuição da tolerância à glicose e redução do *clearance* de insulina, com acentuada hiperinsulinemia. Talvez os resultados mais surpreendentes, entretanto, tenham surgido de estudos de camundongos *knockout* tecido-específicos do IR na célula beta e no sistema nervoso central. O primeiro exhibe defeito acentuado na secreção de insulina estimulada por glicose, semelhante ao observado no diabetes tipo 2, enquanto o último exhibe aumento da ingestão alimentar, adiposidade discreta, resistência à insulina e hipertrigliceridemia, assim como redução da fertilidade em decorrência de hipogonadismo hipotalâmico. Em conjunto, esses achados sugerem uma hipótese unificadora para o diabetes tipo 2, na qual a resistência à insulina em órgãos-alvo clássicos (fígado, músculo e tecido adiposo), combinada à resistência à insulina na célula beta, cérebro e outros tecidos, pode resultar no diabetes tipo 2<sup>21, 22</sup>.

Na década de 90, o primeiro elo molecular entre inflamação e obesidade, o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), foi identificado quando se descobriu que esta citocina inflamatória apresenta expressão aberrante no tecido adiposo de modelos animais de obesidade. Assim como nos camundongos, TNF- $\alpha$  é hiper expresso no tecido adiposo e no músculo esquelético de humanos obesos<sup>24</sup>.

A partir de então, surgiram cada vez mais evidências da existência de uma resposta inflamatória ampla na obesidade, além da demonstração de que muitos mediadores inflamatórios exibem padrões de expressão e têm impacto sobre a ação da insulina semelhante ao TNF- $\alpha$  na obesidade, em diversos modelos animais<sup>24</sup>.

O alto grau de coordenação entre as vias inflamatórias e metabólicas é ressaltado pela sobreposição das atividades e funções biológicas de macrófagos e adipócitos na obesidade. A expressão de genes por estes dois tipos celulares é muito semelhante. Os macrófagos expressam praticamente todos os genes expressos pelos adipócitos, como FABP aP2 (também chamado FABP4) e PPAR $\gamma$ , enquanto os adipócitos podem expressar muitas proteínas dos macrófagos, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e MMPs. A capacidade funcional destas duas células também se sobrepõe. Os macrófagos podem captar e armazenar lipídios, tornando-se células espumosas envolvidas no processo de aterosclerose. Os pré-adipócitos, sob determinadas condições, podem exibir atividade fagocítica e antimicrobiana e até mesmo ser capazes de se diferenciar em macrófagos. Além disso, na obesidade, macrófagos se acumulam no tecido adiposo branco, ao lado dos adipócitos. Estes macrófagos, no tecido adiposo, contribuem para a produção de mediadores inflamatórios que podem induzir resistência à insulina<sup>24</sup>.

Apesar de estar evidente a existência de um estado de inflamação crônica de baixo grau em paralelo a obesidade e diabetes tipo 2, os mecanismos através dos quais as citocinas inflamatórias e ácidos graxos medeiam a resistência à insulina ainda não estão totalmente esclarecidos. A inibição das vias de sinalização intracelulares da insulina é um mecanismo primário através do qual os sinais inflamatórios podem levar à resistência à insulina<sup>21</sup>.

A fosforilação inibitória do IRS-1 em serina é observada na obesidade e em grandes queimados. Recentemente, estudos genéticos e bioquímicos apontaram para a via da JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) como uma das responsáveis por esta fosforilação inibitória do IRS-1 (serina 307), bem como documentaram a ativação da via da JNK pelo TNF- $\alpha$ <sup>24</sup>.

Camundongos obesos que não expressam a isoforma 1 da JNK (JNK-1) apresentam proteção contra a resistência à insulina e adiposidade reduzida. A inibição farmacológica da JNK também evita a fosforilação do IRS-1 em serina 307 estimulada pelo TNF- $\alpha$  e restaura a fosforilação do IRS-1 em tirosina estimulada pela insulina, elevando a sensibilidade à insulina. Portanto, como a JNK pode ser ativada pelo TNF- $\alpha$  e por outras citocinas, além de ácidos graxos, e estes se encontram elevados na síndrome de resistência à insulina, a JNK parece ser um elemento chave para onde convergem diferentes sinais que reduzem a ação da insulina<sup>24</sup>. A via da JNK é também uma importante via de produção de resposta inflamatória,

e assim pode estabelecer uma conexão entre *stress*/inflamação e regulação metabólica além de ser uma via com potencial terapêutico para diabetes e aterosclerose.

Recentemente, também foi descrito que a mTOR (*mammalian target of rapamycin*) pode fosforilar o IRS-1 em serina 307 na presença do TNF- $\alpha$ . A supressão de serinas/treoninas-fosfatases ou a ativação de proteínas-tirosinasfosfatases (PTPases) também pode ser importante na resistência à insulina provocada pelo TNF- $\alpha$ .

Além da via da JNK, outra via inflamatória ativada pelo TNF- $\alpha$  tem recebido muita atenção nos últimos: a via da I $\kappa$ B-IKK-NF $\kappa$ B. Em células em cultura, o bloqueio da atividade desta via pode evitar o surgimento de resistência à insulina induzido pelo TNF- $\alpha$ . Em animais com obesidade induzida geneticamente ou por dieta, o bloqueio da atividade da IKK $\beta$  através da administração de altas doses de salicilatos ou da mutação em um alelo da IKK $\beta$  resulta em melhora da sensibilidade à insulina. A IKK $\beta$  pode interferir na sinalização de insulina através de pelo menos duas vias: primeiro, ela pode fosforilar diretamente o IRS-1 em resíduos de serina; segundo, ela pode ativar indiretamente o NF $\kappa$ B, um fator de transcrição que, dentre outros alvos, pode estimular a produção de vários mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- $\alpha$  e a IL-6. É interessante notar que, tanto IKK $\alpha$  quanto IKK $\beta$  podem, *in vitro*, agir nos mesmos resíduos de serina que a JNK, o que levanta a possibilidade de existir um *cross-talk* entre essas duas vias na regulação da ação da insulina<sup>21,24</sup>.

A ativação destas quinases na obesidade, especialmente IKK e JNK, ressalta a sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias: estas são as mesmas quinases que são ativadas na resposta imune inata pelo TLR (*Toll-like receptor*) em resposta aos LPS, peptidoglicanos, RNA de dupla fita e outros produtos microbianos. Os TLRs representam um papel crítico na resposta imune inata em mamíferos. Estudos em animais com mutação ou inativação genética do TLR4 são protegidos contra resistência à insulina no fígado e músculo e os animais com mutação deste receptor são protegidos contra a obesidade induzida por dieta. Estes resultados sugerem que o TLR4 é um modulador do *cross-talk* entre vias metabólicas e inflamatórias.

Figura 6: Modelo para interrelações entre obesidade, resistência à insulina e diabetes através das vias inflamatórias

iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) e SOCS (*suppressors of cytokine signaling*), cujos genes são alvos das vias da JNK e IKK, também estão implicados na resistência à insulina

promovida pelo TNF- $\alpha$ . A expressão da iNOS é estimulada pelo TNF- $\alpha$  e está elevada na obesidade; camundongos com mutações no gene da iNOS desenvolvem menos resistência à insulina associada à obesidade do que seus controles com gene intacto da iNOS.

A expressão de várias isoformas de SOCS, especialmente da SOCS-3, aumenta na presença de TNF- $\alpha$  e na obesidade e pode induzir resistência à insulina, provavelmente através do aumento da degradação do IRS-1 mediada por proteossomos.

Outro mecanismo de resistência à insulina foi descrito: a S-nitrosação do receptor de insulina, do IRS-1 e da Akt. O óxido nítrico produzido pela iNOS pode induzir resistência à insulina no músculo através de um mecanismo que envolve a S-nitrosação do IR, IRS-1 e Akt in vitro e também em modelos animais de obesidade e resistência à insulina.

Recentemente descobriu-se que vias de sinalização inflamatória podem também ser ativadas pelo *stress* metabólico originado do interior da célula ou de moléculas sinalizadoras extracelulares. Foi demonstrado que a obesidade sobrecarrega a capacidade funcional do retículo endoplasmático (RE) e que este “*stress* do RE” leva à ativação de vias de sinalização inflamatórias e assim agrava a resistência à insulina. Além disso, o aumento do metabolismo de glicose pode levar a um aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento da produção de EROs na obesidade leva à maior ativação de vias inflamatórias<sup>24</sup>.

### **1.3- Topiramato**

O topiramato (TPM) é um anticonvulsivante que atua como estabilizante de humor e como neuroprotetor, e classicamente utilizado no tratamento de: epilepsia, enxaqueca, hipertensão intracraniana, dor neurogênica, alcoolismo, transtorno bipolar e transtorno do estresse pós-traumático<sup>25,26,27,28,29</sup>.

O topiramato é rapidamente absorvido e possui farmacocinética linear. Entre seus efeitos estão a potencialização da atividade do GABA, a diminuição da atividade dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, a inibição da anidrase carbônica e o antagonismo da atividade do glutamato nos receptores não-NMDA (N-metil-D-aspartato)<sup>26,27</sup>.

Após a introdução deste medicamento no mercado na década de 80, estudos vindos de diferentes fontes mostraram que pode diminuir a fome, estabilizar o humor e facilitar o auto-

controle, resultando em perda de peso em muitos pacientes<sup>30,31</sup>. O topiramato é uma medicação inicialmente liberada para tratamento da epilepsia, que atualmente também é amplamente prescrita para a profilaxia da enxaqueca. Alguns estudos no início da década de 2000 comprovaram a eficácia dessa droga em reduzir o peso de pacientes obesos (em doses testadas de 64 até 384 mg/dia)<sup>32</sup>, fato anteriormente observado nos ensaios clínicos envolvendo pacientes epiléticos normais e obesos. A eficácia da droga aumentava muito pouco com o aumento das doses a partir de 192 mg/dia, e com o inconveniente de aumento de efeitos adversos. Um ponto interessante observado nesses estudos é a continuação da perda de peso por até mais de um ano de tratamento, sem o platô observado geralmente por volta de seis meses com o uso das demais drogas existentes<sup>32</sup>. O topiramato também foi testado em pacientes obesos com TCAP, com bons resultados na perda de peso e redução de escores de compulsão<sup>33</sup>. Entretanto, apesar de mostrar-se altamente eficaz, o entusiasmo com a droga diminuiu consideravelmente devido à elevada incidência de efeitos colaterais muito pouco tolerados pelos pacientes, tais como: parestesias, alterações de memória, dificuldade de concentração e alterações do humor. Enquanto é sabido que exerce sua atividade antiepilética pelo bloqueio de canais de sódio e cálcio, potencialização da ação do GABA e inibição da anidrase carbônica, seu mecanismo de ação como agente redutor do peso ainda é desconhecido. Em modelos animais, o topiramato tanto reduz o apetite como interfere na eficiência da utilização de energia, ao aumentar a termogênese e a oxidação de gorduras (mediante o estímulo da lipoproteína lipase no tecido adiposo marrom e musculoesquelético<sup>32</sup>).

Em modelos animais o tratamento com topiramato pode aumentar os níveis de CRH (corticotropin-releasing hormone) no hipotálamo, o qual é um neuropeptídeo anorexigênico<sup>34</sup>, gerando, assim, um quadro de anorexia. Em contraste, alguns estudos em animais sugerem o oposto. O tratamento com topiramato foi associado com aumento dos níveis hipotalâmicos de NPY (neuropeptide Y), o qual é um neuropeptídeo orexigênico, podendo aumentar a ingestão alimentar<sup>35,36</sup>.

Adicionalmente, estudos clínicos apóiam a evidência de que o tratamento com topiramato pode alterar mecanismos sensitivos de sabor, o que poderia, também, gerar uma redução da ingestão de alimentos<sup>37,38</sup>.

Em relação ao balanço energético, estudos sugerem que o topiramato pode reduzir o estoque de energia e aumentar o gasto energético e termogênese<sup>23,39</sup>. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais o tratamento com topiramato controla o peso corpóreo ainda não foram esclarecidos.

---

## *2 - OBJETIVO*

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da droga topiramato em camundongos Swiss, tratados com dieta hiperlipídica, sobre:

- A sensibilidade à insulina no hipotálamo no seu efeito anorexigênico.
- A transmissão do sinal da insulina através da fosforilação: da via IR/IRS-1/PI3-K/AKT.
- Gasto energético.

---

### *3- MATERIAL E MÉTODOS*

### **3.1- ANTICORPOS, REAGENTES QUÍMICOS E MATERIAIS.**

A insulina regular humana (Humulin R) foi adquirida da Lilly. Os reagentes evaparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilaminav(TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (<sup>125</sup>I) foi adquirida da Amersham (Amersham, UK), e a Proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 µm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da Cristália (Itapira/SP, Brasil). O Anti-pAKT [Ser<sup>473</sup> ] (9271, rabbit polyclonal) foi adquirido da Chemicon Int. (Temecula, CA, USA) e anti-pJNK (#07-088, rabbit polyclonal) foi adquirido da Upstate Biochnology (Lake Placid, NY, USA). LPS de bactérias Gram-negativas foi adquirido da Sigma.

### **3.2- SOLUÇÕES UTILIZADAS**

Tampão de extração A (extrato total): será utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM. O ortovanadato deve ser colocado no momento de utilização do tampão.

Tampão de Laemmli (5X): Será usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão que será utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída 1:4.

Solução tampão para transferência: será empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida estocada a 4°C.

Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas: contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

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 0,02%.

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: foi utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que são posteriormente imunoprecipitadas.

Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X-100 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescentados no momento do uso. Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e Triton X-100 0,5%.

Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

### **3.3- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados camundongos Swiss, com idade entre 4 semanas, pesando aproximadamente 30 gramas, fornecidos pelo biotério Central da Unicamp (CEMIB).

Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, contendo 1 camundongo por gaiola e mantidos (22 +/- 1° .C), em ciclo de 12 horas de luz (06h-18h) e 12 horas no escuro (18h – 6 h), e divididos randomicamente em quatro grupos:

- Grupo tratado com dieta hiperlipídica + topiramato por 7 dias (grupo 1)
- Grupo tratado com dieta hiperlipídica + Veículo por 7 dias (grupo 2)
- Grupo tratado com ração comercial Nuvital® (Nuvilab) + topiramato por 7 dias (grupo 3)
- Grupo tratado com ração comercial Nuvital® (Nuvilab) + veículo por 7 dias (grupo 4)

Os animais dos grupos 1 e 2 foram alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas. e então submetidos ao tratamento com topiramato ou veículo por 7 dias antes do experimento. Os animais do grupo 3 e 4 foram alimentados com dieta padrão por oito semanas e tratados

com topiramato ou veículo por 7 dias antes do experimento.

A dieta hiperlipídica é composta de:

<b>Componentes</b>	<b>Controle (g/kg)</b>	<b>Dieta hiperlipídica (g/kg)</b>
Gordura de porco	0,0	330,0
Amido	202,0	123,5
Sacarose	100,0	100,0
Dextrina	130,5	132,0
Caseína	397,0	200,0
L-cistina	3,0	3,0
Cloridrato de colina	2,5	2,5
Óleo de soja	70,0	0,0
Mistura de sais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	30,0	30,0
Fibras	50,0	50,0

### **3.4- CANULAÇÃO DE VENTRÍCULO LATERAL**

Animais foram anestesiados através da administração intra-peritoneal de uma mistura de hidrocloreto de quetamina e diazepam (70:30) (50 mg/kg, intraperitoneal) e posicionados sob o aparelho estereotáxico para implante de cânula no ventrículo lateral direito, seguindo as coordenadas obtidas no Atlas Paxinos-Watson,<sup>40</sup>. Após a fixação da cabeça do animal será feita uma incisão, o periósteo será aberto expondo a sutura sagital. O bregma será usado como ponto de referência e um orifício será perfurado no osso parietal na junção das coordenadas: lateral e anteroposterior. A cânula será posicionada no orifício central e rebaixada cuidadosamente até que a coordenada dorsoventral seja alcançada. A cânula será fixada no

crânio usando uma resina. Após a secagem da resina o animal é retirado do aparelho e permanecerá de 6-7 dias se recuperando do procedimento cirúrgico. A confirmação da posição das cânulas será feita através da injeção intracerebroventricular (ICV) de angiotensina II, que induz efeito dipsinogênico.

### **3.5- EXTRAÇÃO DE TECIDOS, IMUNOBLOT E IMUNOPRECIPITAÇÃO**

Os animais foram anestesiados e as injeções ICV foram administradas com insulina ou salina. Após 15 minutos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o hipotálamo inteiro foi extraído do cérebro e imediatamente homogeneizado em tampão de extração adequado a 4 °C com Polytron durante 30 s. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 40 minutos em centrífuga “Eppendorf” refrigerada. O “pellet” foi desprezado e amostras do sobrenadante foram usadas para medida da concentração protéica, utilizando-se o reagente para o ensaio Bio-Rad Protein Assay-Dye Reagent concentrate (Melville, NY). Foi utilizado como referencial, uma curva-padrão de albumina.

Amostras contendo 0,1 mg de proteína total foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletro-transferência do minigel da Bio-Rad, sendo realizadas durante 120 min a 80 V em gelo, banhadas com tampão de transferência. Após transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução Tris-salina durante duas horas e depois foram lavadas com solução Tris-salina em três sessões de cinco min. A seguir foi adicionada a membrana anticorpos específicos: anti-fosfo-IR, anti-fosfo-AKT, anti-fosfo-OBR, anti-fosfo-JAK2, anti-fosfo-STAT3. Em seguida foram incubadas com anticorpo secundário para serem reveladas através de ECL em filme de raio X (Kodak XAR-Rochester, NY). Após a revelação das autoradiografias e visualização das bandas, estas foram submetidas à densitometria óptica, utilizando o equipamento Eagle Eye Scanner (Stratagene). Com estes dados foram realizada análise estatística comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos.

Para imunoprecipitação 0,5mg de proteínas totais foram incubadas overnight com anticorpo específico e proteína A sefarose e após sucessivas lavagens seguiram o mesmo procedimento para extrato total.

### **3.6- DETERMINAÇÃO DA POSOLOGIA**

A droga foi administrada por via gavagem. Diluída em água na dose de 110mg/kg uma vez por dia durante 7 dias.

### **3.7- ESTUDO DA REGULAÇÃO DO GASTO ENERGÉTICO**

#### **CONSUMO DE OXIGÊNIO**

Animais obesos tratados com ASO ou CAY10576, para inibir IKK $\epsilon$ , serão submetidos a medição do consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e determinação da média de trocas gasosas, através de um circuito aberto indireto calorimétrico (Oxymax Deluxe System; Columbus Instruments, Columbus, OH), como descrito previamente<sup>41</sup>.

#### **EXPRESSÃO DE UCP-1**

Para investigar se a inibição da IKK $\epsilon$  pode alterar a termogênese, incluiremos o estudo da expressão da proteína UCP-1 (uncoupling protein 1) no tecido adiposo marrom como uma medida indireta de termogênese nos animais tratados com ASO ou CAY10576. A UCP-1 é uma proteína mitocondrial desacopladora de prótons e sua maior expressão é associada com aumento de termogênese<sup>42</sup>.

### **3.8 - APRESENTAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

Todos os resultados numéricos serão demonstrados e expressos com média  $\pm$  desvio da média seguido do número de experimentos. Os resultados de “Western blot” serão apresentados com comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias, as quais serão quantificadas através de densitometria usando o programa “Scion Image” (Scion Corp). Os dados serão analisados através do teste “t de Student’s”, comparando dois grupos; a análise

de variância (ANOVA) será seguida por análise de significância (Bonferroni) quando necessário, comparando os grupos controle e experimental. A significância estatística adotada será de  $p < 0,05$ .

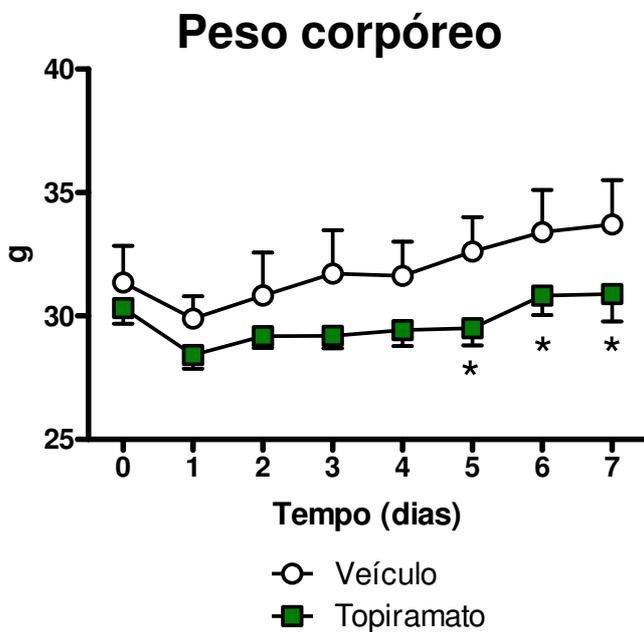
---

## *4- RESULTADOS*

O tratamento com topiramato foi realizado inicialmente nos animais em dieta padrão por 7 dias. Na Fig 1A observou-se que o tratamento com TPM reduziu o peso corpóreo dos animais após o sexto dia de tratamento em comparação ao grupo veículo. A ingestão alimentar de 24h foi menor no grupo tratado com TPM em comparação ao grupo que recebeu veículo (Fig 1B). Para investigar se os animais tratados com TPM eram mais sensíveis à insulina em relação à ingestão alimentar, esses animais tiveram o ventrículo lateral canulado e receberam injeção intracerebroventricular (ICV) de insulina ou salina. Observou-se redução significativa na ingestão alimentar de 4 e 8h após injeção ICV de insulina tanto no grupo tratado com veículo quanto no grupo tratado com TPM (Fig. 2A, B).

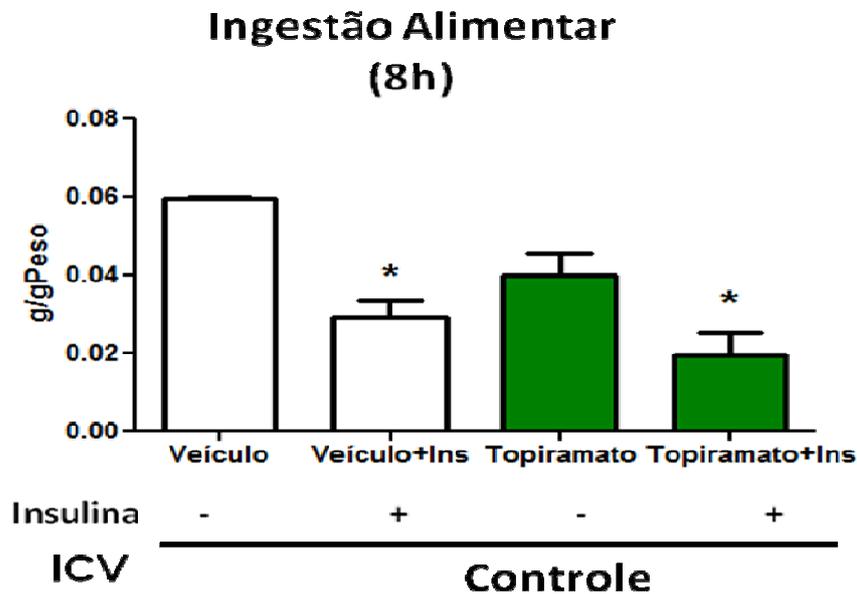
**Figura 1**

A)





B)

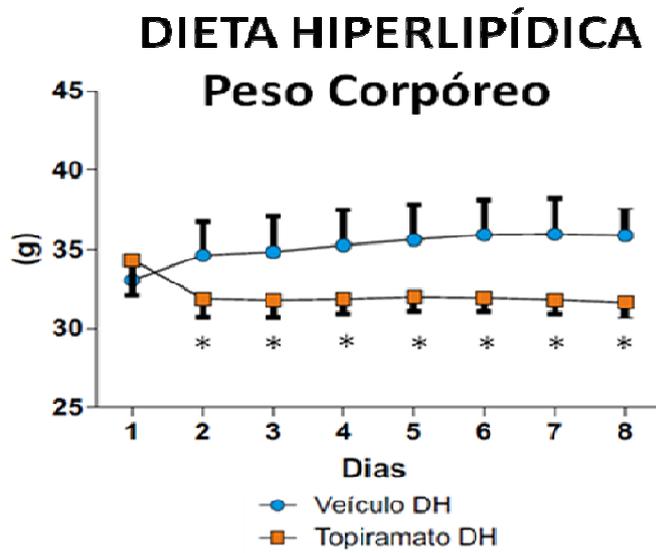


**Legenda Figura 2:** Ingestão alimentar (g/gpeso) de animais controles tratados com topiramato ou veículo por 7 dias que receberam injeção intracerebroventricular (ICV) de insulina ou salina. O tratamento com as drogas foi realizado por gavagem. \* $p < 0.05$  vs veículo.  $n = 5-9$  animais por grupo.

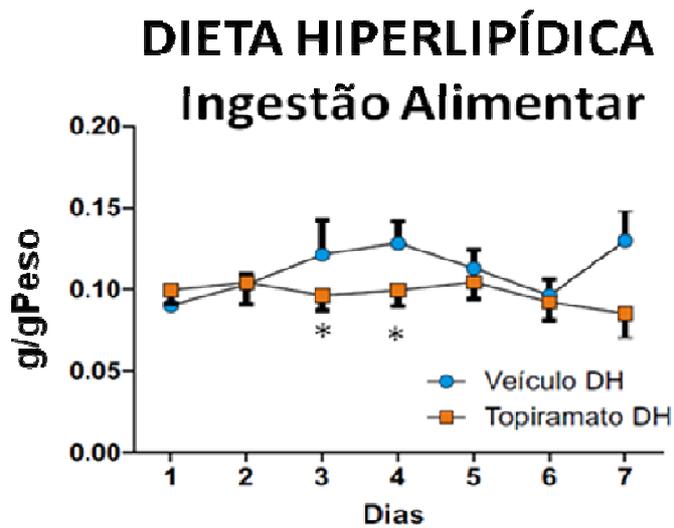
Em adição, animais com obesidade induzida por dieta foram tratados com topiramato ou com veículo por 7 dias. Na Fig. 3A foi demonstrado que o peso corpóreo dos animais obesos tratados com TPM foi significativamente reduzido a partir do segundo dia de tratamento em comparação ao grupo de obesos que recebeu veículo. A ingestão alimentar foi também menor nos animais obesos tratados com TPM nos dias 3 e 4 do tratamento (Fig. 3B).

Figura 3

A)

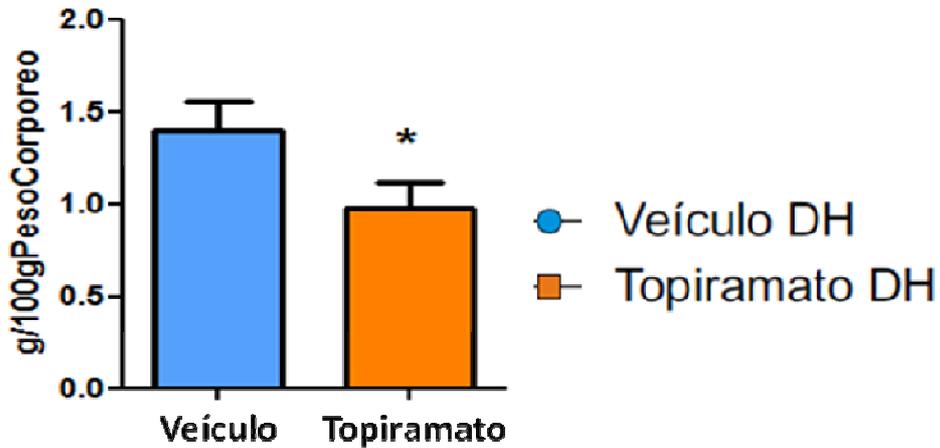


B)



C)

## Massa Adiposa Epididimal

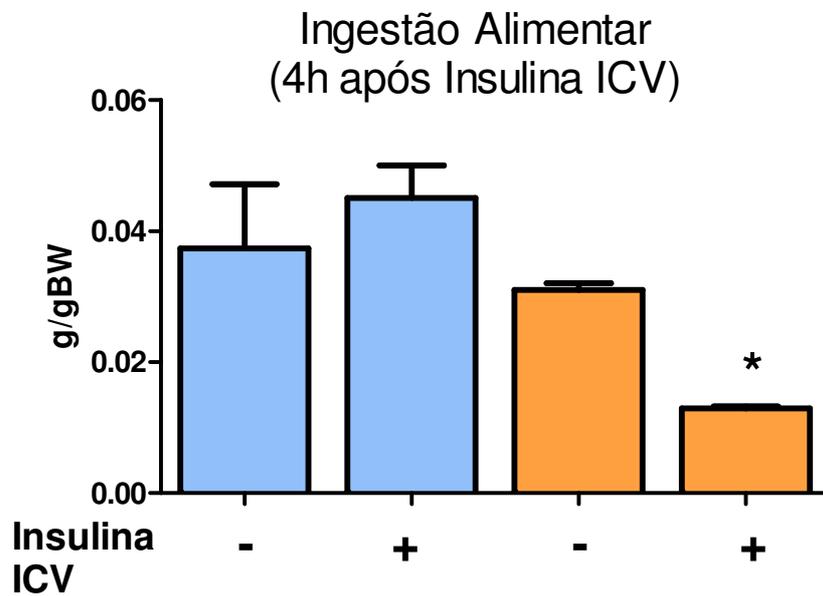


**Legenda Figura 3:** Peso corpóreo (g), ingestão alimentar (g/gpeso) e massa adiposa epididimal (g/100g peso) de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica tratados com topiramato ou veículo por 7 dias. \* $p < 0.05$  vs veículo.  $n = 5-9$  animais por grupo.

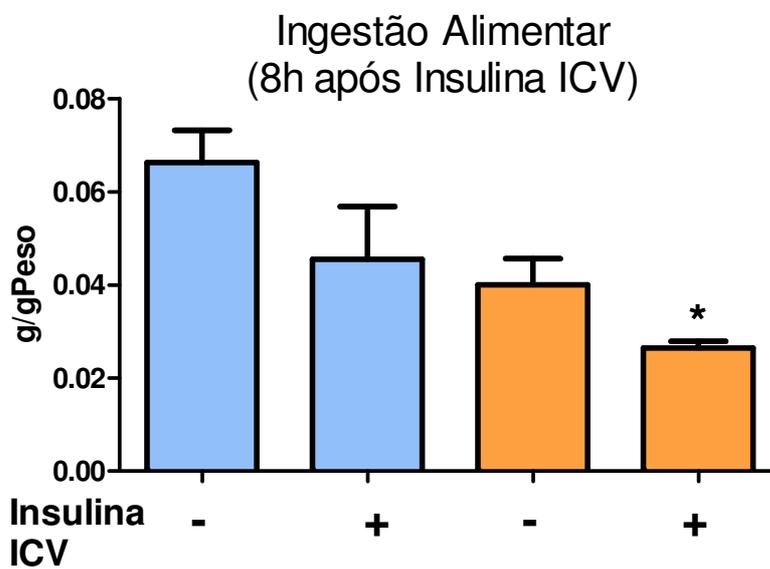
A injeção ICV de insulina reduziu a ingestão alimentar somente do grupo obeso tratado com TPM e não do grupo obeso com veículo. Este resultado foi significativo após 4 e 8h da injeção ICV de insulina (Fig.4A, B).

Figura 4

A)



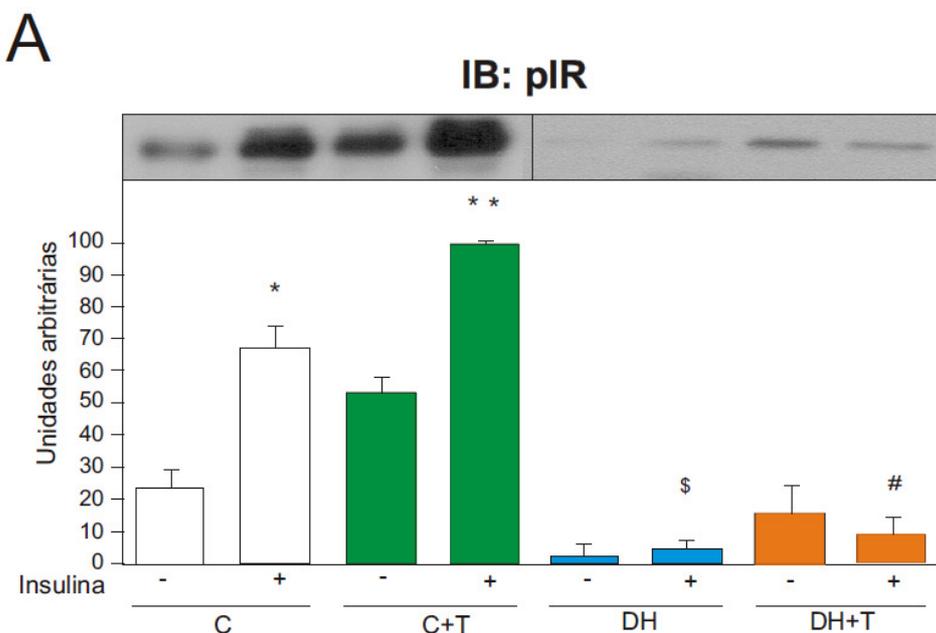
B)



**Legenda Figura 4:** Ingestão alimentar (g/gpeso) de animais obesos tratados com topiramato ou veículo por 7 dias que receberam injeção intracerebroventricular (ICV) de insulina ou salina. O tratamento com as drogas foi realizado por gavagem. \* $p < 0.05$  vs veículo salina.  $n = 5-9$  animais por grupo.

A nível molecular, animais controles tratados com TPM apresentaram maior fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IR) induzido por insulina ICV que o grupo tratado com veículo. Em contraste, os animais obesos não apresentaram maior fosforilação em tirosina do IR em resposta à insulina ICV em ambos grupos (Fig. 5A).

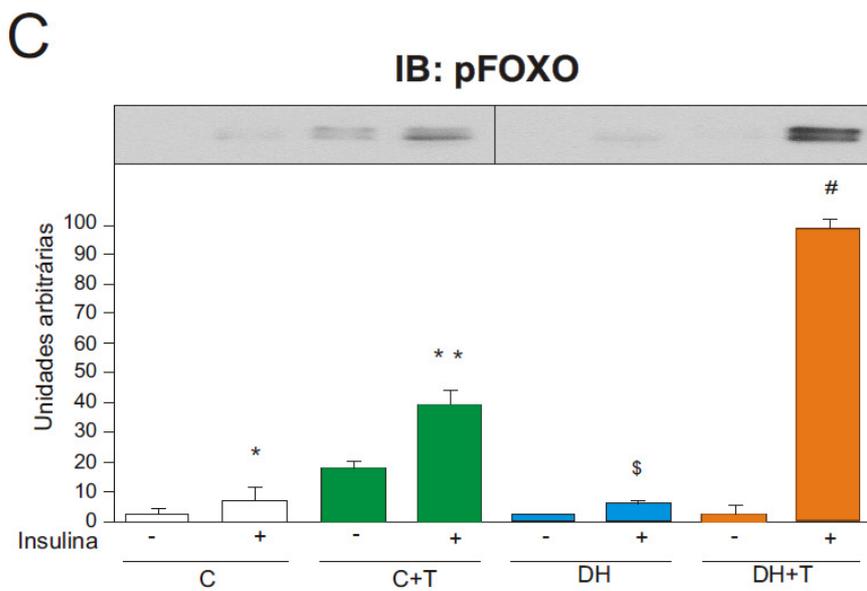
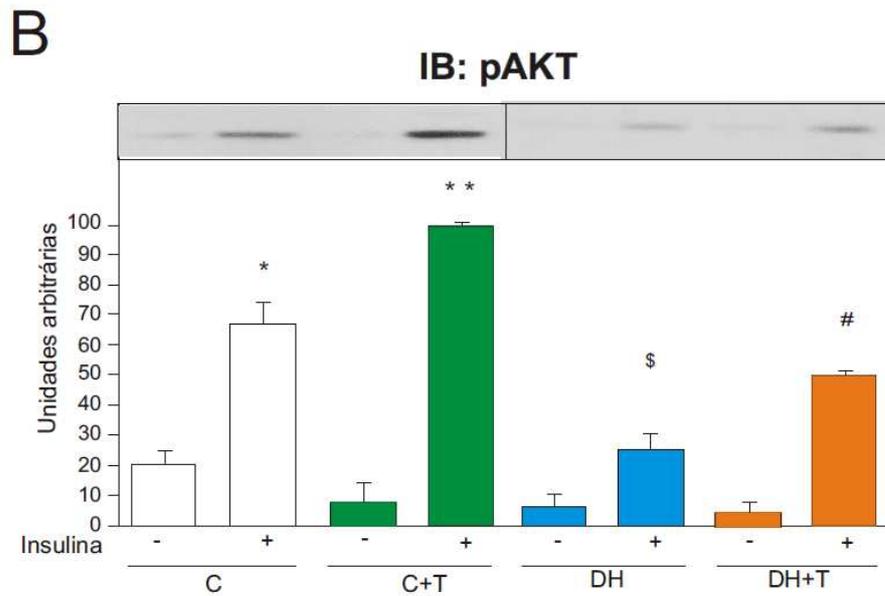
**Figura 5**



A fosforilação da Akt foi maior em resposta à insulina nos animais controles tratados com TPM em comparação aos animais que receberam veículo. Os animais obesos também apresentaram maior fosforilação da Akt após injeção de insulina ICV em comparação aos obesos tratados com veículo (Fig. 5B).

De forma complementar a fosforilação da Foxo1 foi avaliada após estímulo insulínico ICV. A fosforilação da Foxo1 foi maior em resposta à insulina nos animais controles tratados com

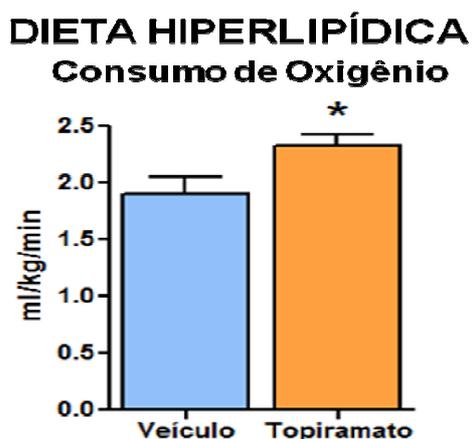
TPM em comparação aos animais que receberam veículo. Os animais obesos também apresentaram maior fosforilação da Foxo1 após injeção de insulina ICV em comparação aos obesos tratados com veículo (Fig. 5C).



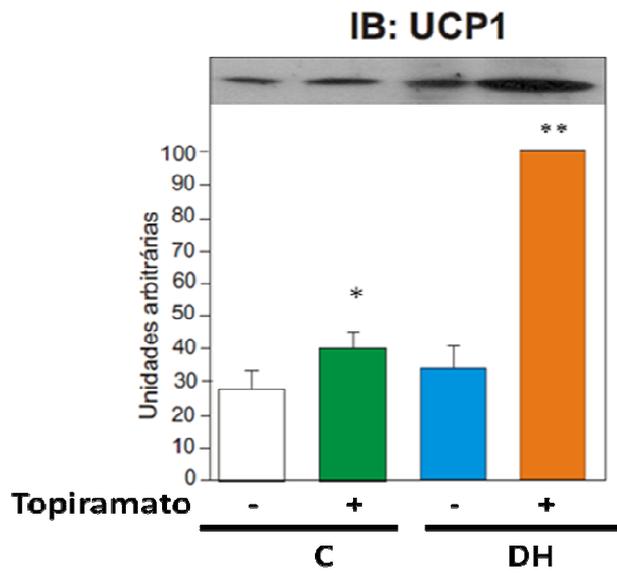
**Legenda Figura 5:** Fosforilação do receptor de insulina (IR), proteína quinase B (Akt) e *forkhead box protein O1* (FOXO1) induzida por insulina de animais controles (C) ou com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH) tratados com topiramato (T) ou veículo por 7 dias. \* $p < 0.05$  vs controle veículo salina; \*\* $p < 0.05$  vs controle topiramato salina; \$ $p < 0.05$  vs. dieta hiperlipídica veículo salina; # $p < 0.05$  vs. dieta hiperlipídica topiramato salina.  $n = 4-5$  animais por grupo.

Além da ingestão alimentar, sabe-se que o gasto energético também influencia o peso corpóreo. Nesse sentido, o consumo de oxigênio foi medido em animais obesos tratados com TPM. Como esperado, o consumo de oxigênio foi significativamente maior nos animais tratados com TPM em comparação com os animais que receberam veículo (Fig. 6A). Adicionalmente, observou-se que a expressão de UCP-1 foi significativamente maior nos animais tratados com TPM tanto os em dieta padrão quanto os obesos. Sendo que nos animais obesos esta diferença foi ainda maior (Fig. 6B).

**Figura 6**  
A)



B)



**Legenda Figura 6: Consumo de oxigênio e expressão de UCP-1 no tecido adiposo marrom de animais controles (C) ou com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH) tratados com topiramato ou veículo por 7 dias. \* $p < 0.05$  vs veículo na mesma dieta.  $n = 5$  animais por grupo.**

---

## *5 - DISCUSSÃO*

Neste estudo, demonstrou-se que a administração de TPM por sete dias em animais controles ou obesos melhora a ação e sinalização hipotalâmica à insulina. Em paralelo, observou-se uma redução na ingestão alimentar e adiposidade e aumento do gasto energético.

Um dos efeitos do TPM é atuar como antagonista de receptores AMPA/KA. A inibição de receptores AMPA/KA tem sido associada à redução de comportamento compulsivo e de vício ou adição em relação à alimentação<sup>43</sup>. Este efeito justifica o uso de topiramato no tratamento de transtorno de compulsão alimentar<sup>44</sup> e também de outros comportamentos aditivos como vício em drogas ilícitas<sup>45</sup>.

Por outro lado, o efeito do TPM ativando receptores GABA A tem sido associado com aumento do peso corpóreo e não o contrário<sup>31</sup>. Entretanto, existe evidência de que ativação de receptores GABA pode reduzir o estímulo à alimentação que ocorre quando animais são submetidos à restrição calórica<sup>46</sup>. Em paralelo aos efeitos nos receptores GABA e AMPA/KA, estudos clínicos demonstraram que o tratamento com TPM pode alterar o sabor dos alimentos. Este efeito poderia ser um elemento explicativo, adicional, para a redução na ingestão alimentar que o TPM pode induzir<sup>37,38</sup>.

A sinalização de insulina é considerada como fator essencial na regulação do balanço energético e atua em diferentes populações neuronais envolvidas com controle de energia corpórea. No sistema nervoso central, os receptores de insulina são expressos em várias regiões, incluindo todos os núcleos do hipotálamo. Está bem estabelecido que a insulina sinaliza através de seus receptores hipotalâmicos, ativando a via PI3-q/Akt/Foxo1, a qual induz o efeito anorexigênico da insulina<sup>47,50</sup>. Nesse estudo, observou-se uma melhora na sinalização de insulina no hipotálamo de animais obesos tratados com TPM. Esta melhora pode ter sido responsável pela redução da ingestão alimentar e redução de adiposidade encontrada nesses animais.

Em paralelo à redução da ingestão, também se observou, que o tratamento com TPM aumentou o consumo de oxigênio, pelo menos, durante uma hora, no ciclo escuro dos animais. Os níveis de UCP-1 no tecido adiposo marrom foram elevados em animais controles e obesos tratados com TPM. Estes resultados, em conjunto, sugerem aumento do gasto energético induzido pelo tratamento com o TPM, independente da dieta administrada.

Estudos sugerem que a ativação do receptor de insulina também ativa a via da MAPK e, por conseguinte, a maior fosforilação das ERK1/2, a qual é associada ao aumento do consumo de oxigênio em modelos animais de obesidade<sup>51</sup>. Porém esta via não foi investigada neste estudo.

Em resumo, os dados apresentados sugerem que o tratamento com TPM, pelo menos, em curto prazo, melhora a ação e sinalização de insulina no hipotálamo de animais controles e obesos. Esta melhora pode ser responsável pela redução na ingestão alimentar e redução na adiposidade. Em adição, o tratamento com TPM aumentou o gasto energético de animais controles e obesos. Este aumento de gasto energético pode ter contribuído com a redução de adiposidade. Assim, pode-se sugerir que o tratamento com TPM pode ser utilizado como terapia alternativa e/ou complementar para a obesidade e resistência à insulina.

---

## *6 - CONCLUSÃO*

A droga topiramato quando administrada em curto prazo, por via gavagem, melhora a sensibilidade hipotalâmica à insulina, com aumento da fosforilação do IR, IRS-1 em tirosina, associação do IRS-1 e PI3-K, além de aumentar a fosforilação em serina da Akt em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Este efeito na sinalização de insulina é associado com o aumento do efeito anorexigênico desse hormônio.

Em adição, o tratamento com topiramato melhora a sensibilidade hipotalâmica à leptina, com maior ativação da via OBR/JAK2/STAT3 em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Este efeito na sinalização de leptina também é associado com o aumento do efeito anorexigênico desse hormônio.

A redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético provavelmente são decorrentes da maior ação da insulina e leptina no hipotálamo e são fatores essenciais nos mecanismos envolvidos na redução da adiposidade dos animais obesos tratados com topiramato.

---

## *7- REFERÊNCIA BLIOGRÁFICA*

1. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002; 46:419-425.
2. Kahn CR. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 1985; 36:429-51.
3. Kasuga M, Karlsson A, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science.* 1982; 215:185-7.
4. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991; 352:73-7.
5. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994; 261:1-4.
6. White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia.* 1997; 40:S2-S17.
7. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Ver.* 1995; 16:117-38.
8. Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem.* 1992; 267:22171-7.
9. Carpenter CL, CANTLEY LC. Phosphoinositide kinases. *Biochemistry.* 1990; 29:11147-56.
10. Ruderman N, Kapeller R, White F, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87:1411-5.
11. Cheatham B, Viohos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of p70S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:4902-11.

12. Shepperd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. *Biochem J.* 1998; 333:471-90.
13. Yenush L, White MF. The IRS-signaling system during insulin and cytokine action. *Bio Essays.* 1997; 19:491-500.
14. Kupriyanova TA, Kandor KV. Akt-2 binds to Glut-4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem.* 1999; 274:1458-64.
15. Saad MJA, Hartmann LGG, Carvalho DS, Galoro CAO, Brenelli SL, Carvalho CRO. Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). *FEBS Lett.* 1995; 370:171-4.
16. Saad MJA, Hartmann LGG, Carvalho DS, Galoro CAO, Brenelli SL, Carvalho CRO. Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats. *Endocrine.* 1995; 3:755-9. Velloso
17. Thirone ACP, Carvalho CRO, Brenelli SL, Velloso LA, Saad MJA. Chronic treatment with growth hormone modulates the early steps of insulin signal transduction in the liver and muscle rats. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 130:33-42.
18. Saad MJA, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CRO, Paiva RS, Velloso LA. Defects in insulin's signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia.* 1997; 40:179-86.
19. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinol.* 1996; 1: 151-9.
20. Verspohl EJ, Ammon HP. Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans. *J Clin Invest.* 1980; 65:1230-7.
21. Shuman GI, Perseghin G, Petersen K. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 200; 27:S6-11.

22. Taniguchi CM, Emanuelli B, KAHN R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006; 7:85-96.
23. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Richard D. Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes. Res.* 2000; 8:656–663.
24. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444:860–867.
25. Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia*. 2000;41:S3-9.
26. Angehagen M, Ben-Menachem E, Rönnbäck L, Hansson E. Novel mechanisms of action of three antiepileptic drugs, vigabatrin, tiagabine, and topiramate. *Neurochem Res.* 2003; 28:333-40.
27. Angehagen M, Rönnbäck L, Hansson E, Ben-Menachem E. Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *J Neurochem.* 2005; 94:1124-30.
28. Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Li H, Rogawski MA. Topiramate reduces excitability in the basolateral amygdala by selectively inhibiting GluK1 (GluR5) kainate receptors on interneurons and positively modulating GABAA receptors on principal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330: 558-66.
29. Bays H. Phentermine, topiramate and their combination for the treatment of adiposopathy ('sick fat') and metabolic disease. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2010; 8: 1777–1801

30. Gadde KM, Allison DB, Ryan DH, Peterson CA, Troupin B, Schwiers ML, Day WW. Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2011; 16;377:1341-52.
31. Stanley BG, Urstadt KR, Charles JR, Kee T. Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiol Behav*. 2011; 25;104:40-6.
32. Astrup A, Toubro S. Topiramate: a new potential pharmacological treatment for obesity. *Obes Res*. 2004; 12:167S-73S
33. Leombruni P, Lavagnino L, Fassino S. Treatment of obese patients with binge eating disorder using topiramate: a review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2009; 5:385-92
34. Husum H, Van Kammen D, Termeer E, Bolwig G, Mathe A. Topiramate normalizes hippocampal NPY-LI in flinders sensitive line 'depressed' rats and upregulates NPY, galanin, and CRH-LI in the hypothalamus: implications for mood-stabilizing and weight loss-inducing effects. *Neuropsychopharmacology*. 2003; 28:1292–1299
35. Erondy N, Gantz I, Musser B et al. Neuropeptide Y5 receptor antagonism does not induce clinically meaningful weight loss in overweight and obese adults. *Cell Metab*. 2006; 4:275–282
36. Erondy N, Wadden T, Gantz I et al. Effect of NPY5R antagonist MK-0557 on weight regain after very-low-calorie diet-induced weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 15:895–905.
37. Silberstein SD, Neto W, Schmitt J, Jacobs D. Topiramate in migraine prevention: results of a large controlled trial. *Arch. Neurol*. 2004; 61:490–495.

38. Ghanizadeh A. Loss of taste and smell during treatment with topiramate. 2009;14:e137-8.
39. Richard D, Picard F, Lemieux C, Lalonde J, Samson P, Deshaies Y. The effects of topiramate and sex hormones on energy balance of male and female rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; 26:344–353.
40. Paxinos, G; Franklin, KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, Second Edition, 2001.
41. Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, et al. Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem.* 2009; 284:36213-22
42. Fromme T, Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300:R1-8.
43. Khazaal Y, Zulino DF. Topiramate induced weight loss is possibly due to blockade of conditioned and automatic process. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63:891-892.
44. McElroy SL, Arnold LM, Shapira NA et al. Topiramate in the treatment of binge eating disorder associated with obesity: a randomized, placebo-controlled trial. *J Psychiatr.* 2003; 160:255-261.
45. Khazaal Y, Zulino DF. Topiramate in the treatment of compulsive sexual behavior: case report. *BMC Psychiatry.* 2006; 6, 22.
46. Turenius CI, Htut MM, Prodon DA et al. GABA(A) receptors in the lateral hypothalamus as mediators of satiety and body weight regulation. *Brain Res.* 2009; 1262:16-24.
47. Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *An NY Acad Sci.* 2010; 1212:97-113.

48. Morton GJ, Schwartz MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 5:S56-62.
49. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol.* 2000; 51:77-255.
50. Belgardt BF, Okamura T, Bruning JC. Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *J Physiol.* 2009; 587:5305-14.
51. do Carmo JM, da Silva AA, Cai Z, Lin S, Dubinina JH, Hall JE. Control of blood pressure, appetite, and glucose by leptin in mice lacking leptin receptors in proopiomelanocortin neurons. *Hypertension.* 2011; 57:26-918.