

Livia Aparecida D'Avila Bitencourt Pascoal Biazzo

**A interleucina 1β desempenha um papel termogênico na
inflamação hipotalâmica induzida por dieta em ratos**

Campinas

2011

Lívia Aparecida D'Avila Bitencourt Pascoal Biazzo

**A interleucina 1β desempenha um papel termogênico na
inflamação hipotalâmica induzida por dieta em ratos**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Fisiopatologia Médica da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre.

Orientador: *Prof. Dr. Lício Augusto Velloso*

Co-Orientadora: *Profa. Dra. Marciane Milanski*

Campinas

2011

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

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso -- CRB-8ª / 6652

de B47i
CAMP
B47i
Ed.
BC 95083
100-4102
D
105112
849990

B47i:

Biazzo, Livia Aparecida D'Avila Bitencourt Pascoal

A interleucina I β desempenha um papel termogênico na inflamação hipotalâmica induzida por dieta em ratos. / Livia Aparecida D'Avila Bitencourt Pascoal Biazzo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Lício Augusto Velloso

Co-orientador: Marciane Milanski

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Hipotálamo. 3. Interleucina-1 β . I. Velloso, Lício Augusto. II. Milanski, Marciane. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Interleukin-1 β plays a thermogenic role in diet-induced hypothalamic inflammation

Keywords: • Obesity
• Hypothalamus
• Interleukin-1 β

Titulação: Mestrado em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

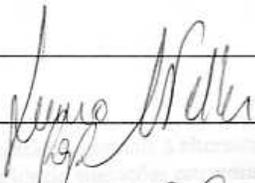
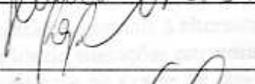
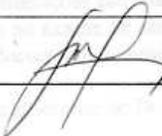
Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Prof. Dr. Patrícia de Oliveira Prada
Prof. Dr. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Data da defesa: 15-03-2011

Banka examinadora de Dissertação de Mestrado

Livia Aparecida D'Avila B. Pascoal

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso

Membros:
Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso - 
Prof(a). Dr(a). Patricia de Oliveira Prada - 
Prof(a). Dr(a). Silvana Auxiliadora Bordin da Silva - 

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/03/2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente, me dar saúde e paz.

Ao Professor Lício pela oportunidade, incentivo, supervisão, apoio e infraestrutura para o desenvolvimento e conclusão deste projeto. Agradeço também por sempre acreditar e apostar nos seus alunos, a cada desafio, uma superação e um crescimento profissional.

A Professora Marciane Milanski por me ensinar boa parte das técnicas desenvolvidas neste trabalho e por estar sempre pronta, a qualquer momento, a me ajudar. Obrigada pela amizade.

As minhas amigas Lelê e Andressa pelo carinho com que sempre me trataram.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo nos estudos, um ensinamento que certamente passarei para os meus filhos. Obrigado por todo amor, carinho, respeito e, principalmente confiança.

Ao meu irmão Vinícius por me apoiar e estar sempre ao meu lado. Também agradeço por me ensinar um pouco de Genética Molecular e me orientar no desenvolvimento deste projeto.

Ao meu marido Leandro, uma pessoa incrível que me traz alegria e paz todos os dias, é uma honra viver ao seu lado. Agradeço a compreensão, o apoio e o carinho nos momentos difíceis.

Ao meu filho Murilo por traçar um novo caminho na minha vida.

Um agradecimento especial a Família LabSinCel que acolheu a mim e a minha família, me proporcionou momentos agradáveis e de certa forma cada um de vocês me ensinou algo especial. Agradeço também a todos que cuidaram do Murilo para que eu pudesse terminar meus experimentos.

A Professora Íscia Lopes Cendes, por ter me recebido em seu laboratório e aos seus alunos por me ensinarem a técnica de RNAi.

As agências financiadoras CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado e por financiarem este projeto.

A todos que fizeram parte desta fase de minha vida e foram responsáveis pelo dia de hoje,

meu muito obrigado!

RESUMO

Na obesidade experimental, mudanças na função hipotalâmica desempenham papel importante na regulação anômala da ingestão alimentar e do gasto energético. Estudos recentes mostram que a inflamação hipotalâmica sub-clínica é um importante fator que contribui para a disfunção hipotalâmica na obesidade. Citocinas, como $TNF\alpha$, IL6 e IL10 tem sido estudadas no hipotálamo de modelos animais de obesidade, entretanto, o papel da IL1 β nesta condição não está claro. Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de interferência de RNA conjugado com o peptídeo do vírus da raiva RVG-9R para direcionar a molécula antisense de IL1 β ao sistema nervoso central. Essa manipulação levou a uma redução de 50% na expressão hipotalâmica de IL1 β em ratos obesos e a um aumento do ganho de peso corporal sem afetar a ingestão alimentar e a atividade física espontânea. A redução da expressão da IL1 β no sistema nervoso central foi acompanhada da redução da atividade da enzima citrato sintase da cadeia respiratória mitocondrial e ao aumento da expressão de $PGC1\alpha$ no tecido adiposo marrom desses animais. Assim, propomos que a expressão de IL1 β no hipotálamo de ratos obesos leva ao aumento da termogênese no tecido adiposo marrom que protege contra o ganho de massa corporal excessiva.

ABSTRACT

In experimental obesity, changes in hypothalamic function play an important role in the anomalous regulation of food intake and energy expenditure. Recent studies have shown that a low-grade hypothalamic inflammation is an important factor contributing to hypothalamic dysfunction in this context. Cytokines such as $TNF\alpha$, IL6 and IL10 have been studied in the hypothalamus of experimental models of obesity, however, the role played by IL1 β in this condition is unknown. Here we employed small-interference RNA conjugated with the rabies virus RVG-9R peptide to deliver an IL1 β antisense RNA to the central nervous system. This approach led to a 50% reduction of hypothalamic expression of IL1 β in obese rats and produced an increase in body mass gain without affecting food intake and spontaneous physical activity. Upon central nervous system IL1 β inhibition the brown adipose tissue activity of the respiratory chain mitochondria enzyme citrate synthase was reduced, while the expression of PGC1 α was increased. Thus, the expression of IL1 β in the hypothalamus of obese rats provides a brown adipose tissue-dependent thermogenic mechanism that protects against excessive body mass gain.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AgRP	Proteína relacionada ao “agouti”
ATP	Trifosfato de adenosina
BAT	Tecido adiposo marrom
BHE	Barreira hematoencefálica
C	Citosina
CART	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CCK	Colecistocinina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CRF	Fator liberador da corticotrofina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CT	Tomografia computadorizada
dsRNA	RNA de dupla fita
ENDEF	Estudo nacional da despesa familiar
FFA	Ácidos graxos livres
G	Guanina
GAPD	Desidrogenase de gliceraldeído-3- fosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLP-1	Peptídeo similar ao glucagon-1
HDTAL	<i>Human Development Technical Assistance Loan</i>
HPA	Eixo adrenal-pituitaria-hipotalâmico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICV	Intracerebroventricular
I κ B	Inibidor do Fator Nuclear Kappa B
IKK	Inibidor do Kappa B Kinase
IL1	Interleucina 1
IL1R1/IL1RI	Receptor 1 da interleucina 1
IL1R2/IL1RII	Receptor 2 da interleucina 1
IL-1RAcP	Proteína acessória ao receptor da interleucina 1
IL1 α	Interleucina 1 alfa
IL1 β	Interleucina 1 beta
IL1ra	Antagonista do receptor da interleucina
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corpórea
INFs	Interferons
IR	Receptor de insulina
IRAK1	Quinase 1 associada ao receptor interleucina 1
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor interleucina 1
JNK	Quinase N-terminal c-jun
LH	Hipotálamo lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MyD88	Gene de Resposta Primaria Diferenciação Mieloide 88
NF κ b	Fator Nuclear Kappa B

NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NPY	Neuropeptídeo Y
NRFs	Fatores respiratórios nucleares
OBRb	Receptor de cadeia longa da leptina
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	Tomografia por emissão de positrons
PGC1- α	Co-ativador 1 alfa do receptor α ativado proliferador de peroxissoma
PKR	Proteína Quinase dependente de dsRNA
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
PYY	Peptídeo YY
qPCR	PCR quantitativo
QSP	Quantidade suficiente para
RBP-4	Retinol ligado a proteína 4
RER	Razão de troca respiratória
RGV	Peptídeo do vírus da raiva

RISC	<i>RNA Interference Specificity Complex</i>
RNAi	RNA de interferencia
rpm	Rotação por minuto
SDS PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
siGFP	Pequeno RNA de interferência contra GFP
siIL1 β	Pequeno RNA de interferência contra IL1 β
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SPA	Atividade física espontânea
SNC	Sistema nervoso central
TAB1	Proteína 1 ligadora da TAK1
TAB2	Proteína 2 ligadora da TAK1
TAB3	Proteína 3 ligadora da TAK1
TAK1	Fator de crescimento transformador β
TG	Triglicerídeos
TICAM	Molécula adaptadora contendo TIR
T	Timina
TIR	<i>Toll/IL1-R homology</i>
TLR 4	<i>Toll-like receptors 4</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
TRAM	Molécula Adaptadora contendo TRIF

TRH	Hormônio liberador de tirosina
TRIF	Proteína adaptadora que contém domínio TIR
UCP-1	Proteína desacopladora 1
UCP-3	Proteína desacopladora 3
UTR	Regiões não traduzidas
WAT	Tecido adiposo branco
α – MSH	Peptídeo alfa-melanócito-estimulante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Obesidade	14
1.2 O papel do hipotálamo no controle da fome e do gasto energético	19
1.3 A inflamação hipotalâmica na obesidade	24
1.4 A interleucina 1 beta	29
1.5 A interleucina 1 beta no SNC	31
1.6 O papel do tecido adiposo marrom e do músculo esquelético na termogênese	35
1.7 A técnica de interferência por RNA	39
2. OBJETIVO	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Animais e dieta	44
3.2 Protocolos experimentais	45
4. CAPÍTULO 1 - ARTIGO	53
5. CONCLUSÃO	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que contribui para o desenvolvimento de uma série de outras doenças e aumenta o risco de morte precoce (World Health Organization, 2011). Dentre outras, as mais importantes doenças associadas à obesidade são: diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão arterial, aterosclerose, doenças hepáticas e alguns tipos de câncer (World Health Organization, 2011).

Uma das formas de se avaliar a obesidade é através do cálculo do índice de massa corporal (IMC), sendo este obtido pela divisão do peso em quilos pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Tal equação fornece a mais simples mensuração de sobrepeso e obesidade no nível populacional, independente do sexo e da idade do indivíduo adulto. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os indivíduos com o IMC igual ou superior a 25 como acima do peso (sobrepeso) e aqueles com IMC igual ou superior a 30 como obesos. Estes pontos fornecem um referencial para avaliação individual, mas não se constituem num cálculo seguro para avaliar o grau de adiposidade (World Health Organization, 2011).

Segundo o mais recente levantamento da OMS, 1,6 bilhões de pessoas foram classificadas com sobrepeso e 400 milhões de pessoas foram classificadas com obesidade em todo o mundo, até o ano de 2005. As projeções para o ano de 2015 estimam que a prevalência de adultos com sobrepeso chegue a 2,3 bilhões e a prevalência de adultos obesos a 700 milhões de pessoas em todo o mundo (Frag, 2011,).

A mais elevada prevalência/incidência de obesidade no mundo concentra-se nos EUA, onde um estudo do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), verificou que a prevalência da obesidade foi de 32,2% entre homens, e 35,5% entre as mulheres até 2008, e ainda que a prevalência estimada para a associação de sobrepeso e obesidade (IMC > 25) era de 68,0% da população até esta data (Flegal et al., 2010).

No Brasil, um estudo realizado com 49.359 indivíduos adultos investigou a prevalência da obesidade em 2009 com base no IMC, mostrando que 47% dos homens e 39% das mulheres estavam com sobrepeso, e ainda 11% dos indivíduos, para ambos os sexos, foram considerados obesos (Gigante et al., 2009).

Outro estudo realizado no Brasil pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, com base nas divulgações da Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF, e em parceria com o Banco Mundial no âmbito do Projeto de Assistência Técnica de Desenvolvimento Humano - HDTAL (*Human Development Technical Assistance Loan*) avaliou o estado nutricional da população adulta em 2008-2009 levando em conta as estimativas de prevalência nas condições de excesso de peso e obesidade, diagnosticados com base no IMC. Foi observado que 50,4% dos homens e 46,8% das mulheres estavam com excesso de peso até esta data, e que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres estavam obesos.

Segundo este mesmo estudo, a descrição da tendência secular do estado nutricional de adultos, seguindo estimativas da prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade calculadas a partir dos inquéritos do ENDEF 1974-1975; da PNSN 1989; e das POFs 2002 -2003 e POF 2008-2009, demonstrou que a prevalência de excesso de peso e de obesidade aumentam continuamente ao longo dos quatro inquéritos em homens e

mulheres. Nos 34 anos decorridos entre 1974-1975 a 2008-2009, a prevalência de excesso de peso em adultos aumentou de 18,5% para 50,1% no sexo masculino e de 28,7% para 48,0% no sexo feminino. No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou nos homens de 2,8% para 12,4% e nas mulheres de 8,0% para 16,9%, conforme representado na Figura 1 (IBGE, 2010).

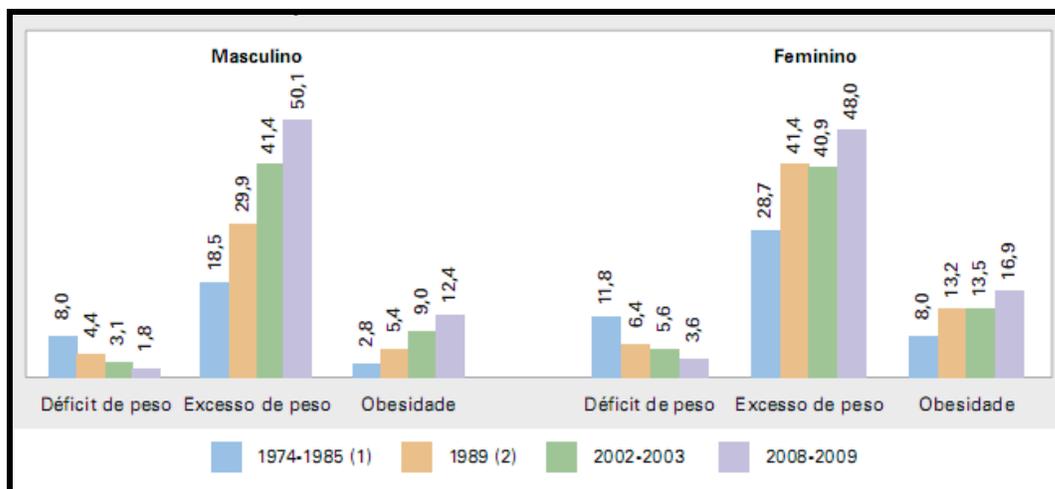


Figura 1: Prevalência do déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população brasileira com 20 anos ou mais de idade, divididos por sexo. Períodos: 1974-1975, 1989, 2002-2003 e 2008-2009 (IBGE, 2010).

O aumento assustador na prevalência desta doença e sua associação com doenças crônicas têm grande impacto econômico, afetando tanto os países desenvolvidos como os países em desenvolvimento. As despesas com saúde atribuídas à obesidade quando comparadas com as despesas totais em saúde do país variam globalmente atingindo 0,7-2% na França e 2,8-5,7% nos EUA (Figura 2). Quando incluídas as despesas de indivíduos com sobrepeso, estas porcentagens chegam a atingir 9,1% do total de despesas com saúde do país. Além disso, os gastos com saúde para indivíduos obesos mórbidos é 81% maior do que indivíduos com peso normal. Este gasto excessivo foi atribuído à maior

frequência de visitas aos consultórios médicos, assistência hospitalar ambulatorial, cuidados hospitalares e com o uso de medicamentos. Nos EUA, estima-se que o custo econômico total da obesidade foi de US \$ 147 bilhões por ano até 2008 e os custos totais indiretos nos EUA para 1999 foi estimado em 66 bilhões de dólares, no entanto, uma vez que a prevalência de obesidade tem aumentado substancialmente desde 1999, os custos deverão ser muito maiores (Farang, 2011,).

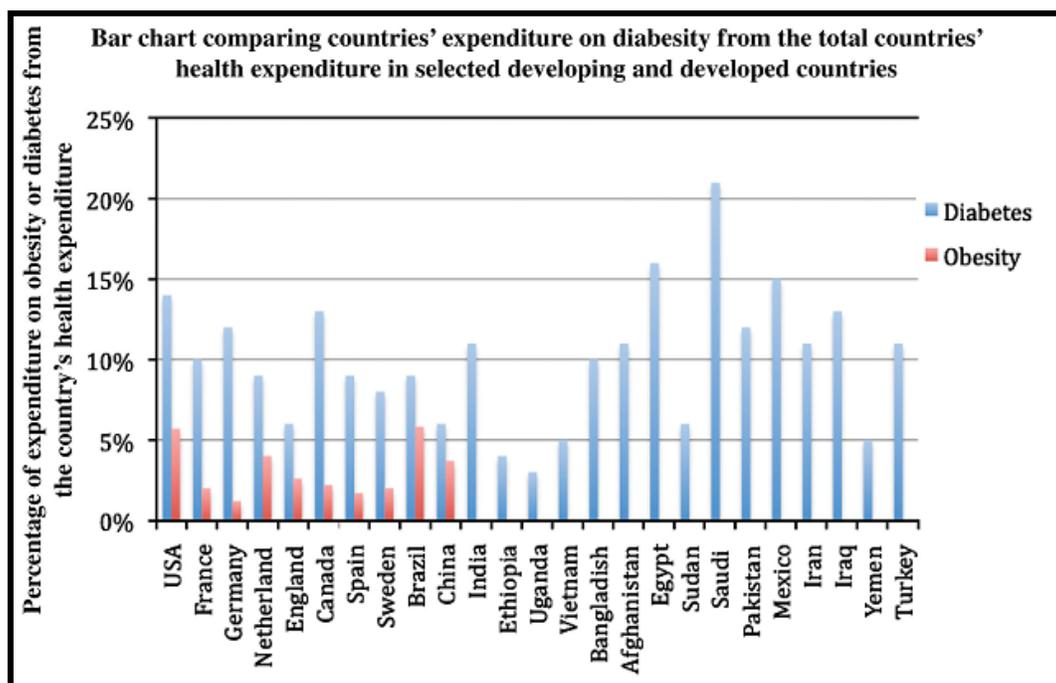


Figura 2: Representação gráfica das despesas com “diabetes” (obesidade e diabetes) em relação às despesas totais de saúde dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Farang, 2011,).

A obesidade ocorre quando há um desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, resultando em um quadro de balanço energético positivo. (Friedman et al., 1998 ; Flier, 2004). As causas deste desequilíbrio se devem à interação entre diversos fatores genéticos, metabólicos, hormonais e ambientais que ainda não foram totalmente esclarecidos. Dentre estes, os fatores ambientais desempenham um papel muito importante na obesidade, que é um dos mais

relevantes fenômenos clínico - epidemiológicos da atualidade (Velloso, 2006). Durante a segunda metade do século XX, populações de vários países do mundo passaram por transformações comportamentais que levaram ao aumento do consumo de alimentos ricos em calorias e à redução da atividade física em razão, principalmente, da mudança do padrão de atividades profissionais (Frag, 2011 e Velloso, 2006).

O aumento da prevalência dessa doença associado com o aumento do gasto em saúde em vários países do mundo tem feito com que governos adotem medidas ou implantem programas cujos objetivos principais são de promover a prevenção e o tratamento da obesidade. No entanto, há vários fatores que dificultam o sucesso do tratamento e controle desta epidemia. Entre estes fatores estão a complexidade de sua etiologia, suas vias moleculares redundantes que controlam a fome e o gasto energético, e, sobretudo, a disponibilidade do paciente em empreender drásticas mudanças no comportamento alimentar e no seu estilo de vida em geral. Além disso, os mecanismos moleculares que controlam a homeostase energética e a termogênese, componente essencial para o controle do peso, ainda não foram completamente elucidados.

O maior interesse na caracterização dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a gênese da obesidade, aliados à necessidade de se desenvolverem métodos terapêuticos mais eficientes têm servido como base para o avanço do conhecimento dos mecanismos que regulam a fome e o gasto energético.

1.2 O papel do hipotálamo no controle da fome e gasto energético

Os distúrbios da homeostase energética corporal dependem em grande parte de desajustes de complexos sistemas neurais, que tem como base anatômica o hipotálamo. Os neurônios localizados em núcleos hipotalâmicos recebem sinais hormonais e nutricionais oriundos da periferia e os convertem em informações que permitem um contínuo ajuste da sensação de fome ao gasto energético. Quando tais ajustes passam a ser controlados de forma anômala, distúrbios da massa corpórea se instalam (Schwartz, et al., 2000).

A leptina é, sem dúvida, o mais importante sinal periférico responsável por estabelecer uma conexão entre os sítios de estoque de energia e o sistema nervoso central. Mutações do gene da leptina ou de seu receptor, que resultem em perda funcional do sistema, levam a quadros graves de obesidade tanto em animais experimentais quanto em humanos (Zhang, et al., 1994 e Friedman, 1998).

A leptina é um hormônio com características estruturais de citocina e sua produção é regulada principalmente em resposta as variações da massa do tecido adiposo e em menor proporção pela ingestão imediata de alimentos, representando o componente dos sinais periféricos com ação mais específica e robusta no controle da adiposidade (Zhang, et al., 1994). A transdução do sinal deste hormônio também sofre importante controle por vias paralelas de sinalização celular, sendo que, de acordo com o conhecimento atual, a insulina se destaca como o principal modulador do sinal da leptina (Carvalho et al., 2001 ; Carvalho et al., 2005).

A insulina desempenha uma função intermediária entre o controle da adiposidade e o controle imediato da fome (saciedade). Os níveis sanguíneos desse hormônio, produzido pelas células beta da ilhota pancreática, oscilam em função da

ingestão imediata de alimentos, mas também em função da massa adiposa total do organismo. A insulina é considerada o segundo mais importante sinalizador periférico para o hipotálamo, não apenas por sua ação abrangente, mas também por atuar como potencializador do sinal da leptina (Flier, 2004 e Velloso, 2006).

Um grupo de hormônios produzidos pelo trato digestório também atuam no controle imediato da saciedade. A grelina é um hormônio peptídico produzido pelo estômago durante um período de jejum prolongado, quando seus níveis crescentes na corrente sanguínea agem no hipotálamo potencializando os efeitos orexigênicos gerados primariamente pela redução da disponibilidade de nutrientes e pelos baixos níveis de leptina e insulina. Logo após a ingestão de nutrientes os níveis de grelina rapidamente caem, dando lugar ao aumento da secreção de hormônios com papel anorexigênico como a colecistocinina (CCK), o peptídeo YY (PYY) e o peptídeo similar ao glucagon (GLP-1). Uma vez elevados no sangue tais hormônios atuam no hipotálamo, em paralelo á insulina, promovendo a indução de sinais anorexigênicos (Schwartz, 2000).

Na última década, as expressões dos receptores da leptina e da insulina, ObRb e IR respectivamente, foram avaliados no sistema nervoso central por vários grupos que observaram que, apesar de ambos os receptores serem encontrados em múltiplas e distintas regiões do cérebro, a presença no hipotálamo, e mais especificamente no núcleo arqueado, era mais marcante (Tartaglia, 1997; Torsoni, et al., 2003; Folli et al., 1994 ; de LAFML, Saad MJ, Velloso LA., 1999). No núcleo arqueado do hipotálamo, duas sub-populações de neurônios agem como sensores de primeira ordem para os sinais oriundos da periferia. Uma expressa os

neurotransmissores orexigênicos neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado Agouti (AgRP), enquanto a outra expressa os neurotransmissores anorexigênicos peptídeo alfa-melanócito-estimulante (α -MSH- clivado a partir de POMC) e peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Flier JS, 2004).

As conexões de ambos os tipos de neurônios se fazem com duas sub-populações distintas tanto no núcleo paraventricular (PVN) quanto no hipotálamo lateral (LH). No PVN existem neurônios que expressam os neurotransmissores hormônio liberador de corticotropina (CRH) e hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (Schwartz, et al., 2000). Ambos os neurotransmissores têm funções anorexigênicas e pró-termogênicas, sendo que o TRH desempenha de forma predominante a função pró-termogênica, enquanto CRH desempenha predominantemente a função anorexigênica (Schwartz, et al., 2000 e Flier , 2004). Por outro lado, no LH também duas sub-populações distintas foram caracterizadas, uma delas expressando a orexina, com papel predominantemente orexigênico, e a outra expressando o hormônio concentrador de melanina (MCH), com papel predominantemente anti-termogênico, conforme ilustrado na Figura 3 (Schwartz, et al., 2000; Flier JS, 2004; Pereira da Silva, 2003).

Estudos recentes revelaram ainda que neurônios do núcleo dorsomedial do hipotálamo possuem receptores de leptina e controlam sinais eferentes para o tecido adiposo marrom, estabelecendo assim uma ligação direta entre o sinal indicador de adiposidade e o controle da termogênese (Zhang, 2001).

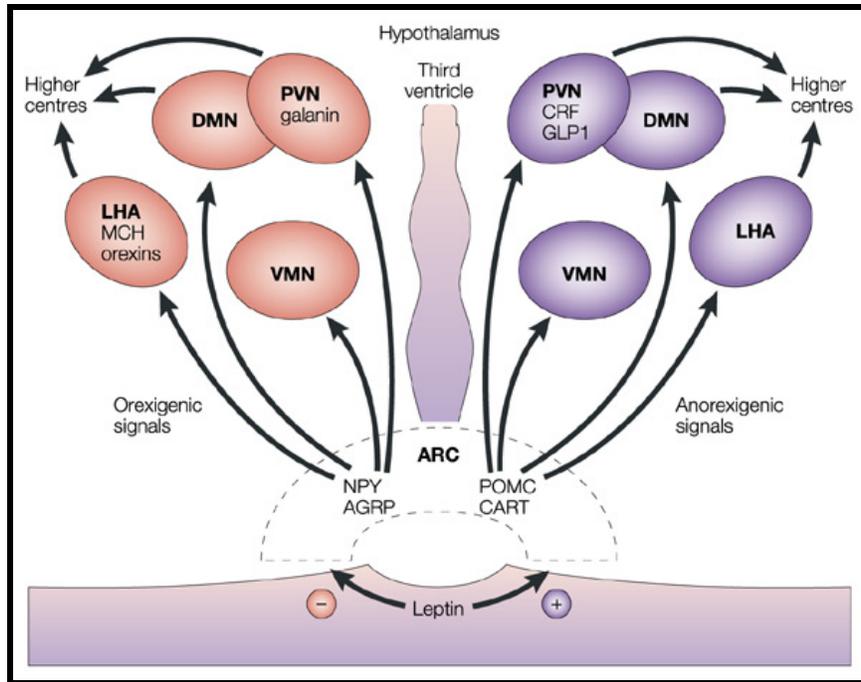


Figura 3: Representação esquemática dos núcleos hipotalâmicos responsáveis pelo controle da ingestão alimentar e gasto energético (Nature 2002).

O controle funcional desses grupos de neurônios é feito principalmente pela integração dos sinais gerados pelos hormônios leptina e insulina, pelos sinais dos hormônios do trato digestório e pela própria disponibilidade de nutrientes. Em situações de jejum prolongado e em indivíduos com baixo percentual de gordura corporal, onde predominam baixos níveis de leptina e insulina, a maior parte dos receptores ObRb e IR no núcleo arqueado está desocupada. Nesta situação, predominam os sinais e conexões excitatórios para os neurônios NPY/AgRPérgicos e os sinais e conexões inibitórios para os neurônios α -MSH/CARTérgicos que, aliados aos níveis elevados de grelina, resultam em um aumento da expressão de orexina e MCH no LH, acompanhado da redução da expressão de TRH e CRH no PVN (Flier JS, 2004; Schwartz et al., 2000).

Por outro lado, após uma refeição, quando principalmente os níveis de insulina se elevam há uma redução da expressão de orexina e MCH no LH e aumento da expressão de TRH e CRH no PVN (Schwartz et al., 2000). Em condições normais somente através da modulação da expressão de cada um destes intermediários os sinais trazidos da periferia pela leptina e pela insulina serão convertidos em respostas funcionais adequadas que, em última instância, manterão um perfeito acoplamento entre a ingestão alimentar e a termogênese, resultando na estabilidade do peso corpóreo (Velloso, 2006).

Com o progressivo acúmulo de conhecimento a respeito da ação hipotalâmica da insulina, logo se suspeitou que também no hipotálamo a leptina e a insulina poderiam interagir e exercer efeitos complementares. Estudos subsequentes confirmaram esta suspeita e este *cross-talk* entre as vias de sinalização da insulina e da leptina logo despertou o interesse a respeito dos possíveis mecanismos de resistência hipotalâmica a sinalização destes hormônios como participantes da gênese da obesidade, de forma semelhante à resistência periférica a insulina já conhecida no diabetes mellitus tipo 2 (Carvalho et al., 2001 e Flier 2004).

Estudos posteriores tornaram claro, então, que as consequências da resistência a insulina seria a redução da atividade anorexigênica e pró-termogênica exercida por este hormônio e ainda, tendo em vista a ação modulatória positiva da insulina sobre a atividade hipotalâmica da leptina, a função adipostática da leptina estaria comprometida na obesidade (Carvalho et al., 2005 e Flier 2004). Assim, a procura por evidências causais da resistência hipotalâmica a estes hormônios tornou-se alvo dos pesquisadores.

1.3 A inflamação hipotalâmica na obesidade

Nos últimos 15 anos, tem-se observado que uma das causas da resistência à insulina na obesidade é o aumento de mediadores inflamatórios atipicamente produzidos em diversos tecidos dos indivíduos obesos. A reversão ou a prevenção da inflamação hipotalâmica por mecanismos farmacológicos ou genéticos previne ou reverte o fenótipo de obesidade, colocando a inflamação hipotalâmica numa posição de destaque na patogênese da obesidade (Wellen, 2005 e Hotamisligil, 2006).

A primeira evidência que mostra a associação entre obesidade e inflamação foi publicada em 1993 por Hotamisligil e Spiegelman. Este trabalho mostrou um aumento do fator de necrose tumoral α (TNF α), uma das principais citocinas pró-inflamatórias encontradas até então apenas em células do sistema imune, no tecido adiposo de animais obesos. Além disso, foi observado que o tecido adiposo de animais obesos possui infiltração de macrófagos, fenômeno este típico dos processos inflamatórios (Hotamisligil, 2003). Posteriormente foi demonstrado que a resistência à insulina induzida em animais obesos era dependente dos níveis de TNF α . Animais experimentais *Knockout* para o gene TNF α ou seus receptores, estavam protegidos da resistência à insulina durante a obesidade (Uysal et al., 1997).

Atualmente sabe-se que além do TNF α , outros mediadores inflamatórios estão aumentados no tecido adiposo e em outros órgãos alvos da sinalização da insulina, como fígado e músculo de camundongos obesos desencadeando a resistência à insulina nestes tecidos (Hotamisligil, 2006). Dentre esses fatores destacam-se a interleucina 6 (IL6), interleucina 1 beta (IL1 β), a proteína C reativa, a

proteína quimiotática de monócitos (MCP 1) (Sartipy,2003) e o fator de transcrição Nuclear factor- κ B (NF κ B), responsável pela regulação da transcrição de diversas proteínas mediadoras de resposta inflamatória(Cai, D.,2003), como demonstrado na Figura 4.

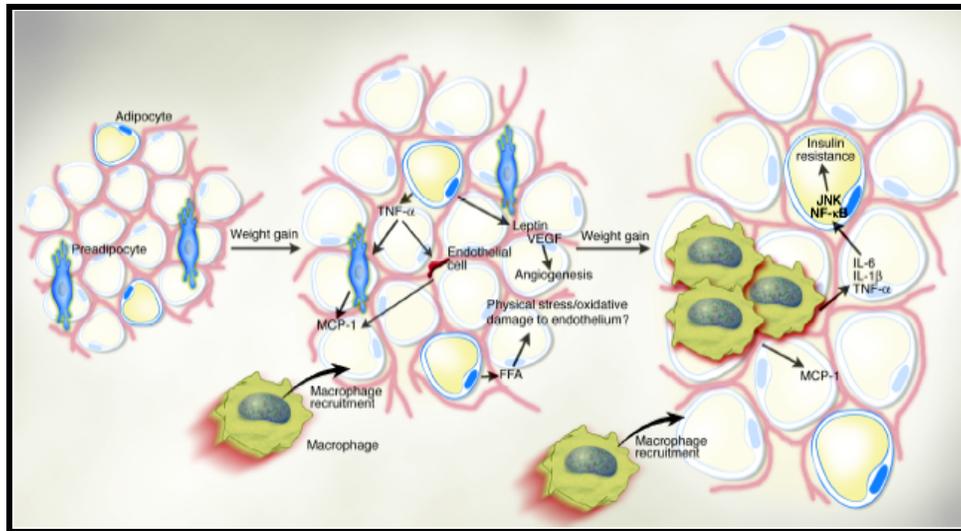


Figura 4: Esquema demonstrando que com a expansão dos adipócitos brancos, há o aparecimento de diversas moléculas características de processos inflamatórios (Cai D, 2003).

No mesmo contexto, estudo realizado pelo nosso grupo em 2005, revelou a presença de citocinas no hipotálamo de roedores obesos (De Souza et al.,2005). Este estudo demonstrou que animais submetidos a uma dieta rica em gordura saturada exibiam em decorrência disso um processo inflamatório central, com a presença elevada de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo. Além disso, através da técnica de *macroarray*, a dieta hiperlipídica promoveu a modulação de 170 especificidades de mRNA.

Houve regulação de mRNAs codificadores de proteínas de várias categorias, entretanto, citocinas e proteínas participantes de resposta pró-inflamatória, como IL-1 β ,

IL-6 e TNF- α foram aquelas que sofreram numericamente, maior modulação (De Souza et al., 2005). Além disso, outro trabalho do grupo demonstrou que apenas alguns tipos de ácidos graxos saturados são capazes de estabelecer uma condição inflamatória no hipotálamo, a ponto de interferir na sinalização correta mediada pelos hormônios insulina e leptina. Foi ainda evidenciado que os ácidos graxos saturados de cadeia longa promovem a mais robusta atividade inflamatória (Milanski et al, 2009).

O principal fator ambiental responsável pela indução da inflamação hipotalâmica é o consumo de dietas ricas em gorduras saturadas. Acredita-se que células da micróglia seja o principal alvo da ação inflamatória dos ácidos graxos saturados. Estas respostas inflamatórias parecem ser iniciadas através de um receptor específico, conhecido como *Toll Like Receptor* (TLR). Os TLRs são proteínas-transmembrana responsáveis pela detecção da invasão do organismo por patógenos (Akira e Takeda, 2004). Os TLRs são expressos em várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, células da micróglia, linfócitos B e tipos específicos de linfócitos T. A expressão dos TLRs também é observada em outros tipos de células como adipócitos, células endoteliais e células do epitélio intestinal (Takeda et al., 2003).

O TLR4 é um subtipo de TLR responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Da mesma forma com que os receptores TLR-4 reconhecem estruturas lipídicas presentes em agentes invasores, ácidos graxos oriundos do consumo dietético podem também ser reconhecidos por este sistema, causando a ativação da via do sistema imune, mesmo sem a presença de um microorganismo invasor (Shi et al., 2006).

A associação dos TLRs com seus ligantes ativa duas vias de sinalização distintas, a via dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e uma via independente do MyD88 (Akira e Takeda, 2004). Após sua ativação, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras contendo um domínio TIR. Há quatro moléculas adaptadoras que exercem esta função: o MyD88, TRIF, TICAM e TRAM (Yamamoto et al, 2002 e Oshiumi et al, 2003). O MyD88 e o TRIF são responsáveis pela ativação de diferentes vias de sinalização, que acarretam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (INFs), respectivamente.

Depois da ativação do TLR, o MyD88 liga-se ao domínio citoplasmático dos TLRs, o que facilita a associação da quinase 4 associada ao receptor de IL-1 (IRAK4) com o receptor. A ligação do MyD88 com a IRAK4 permite a fosforilação de resíduos na quinase 1 associada ao receptor de IL-1 (IRAK1), induzindo a atividade quinase da IRAK1. A IRAK1 ativada autofosforila resíduos na sua região N-terminal e esta hiperfosforilação da IRAK1 possibilita a ligação do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) ao complexo (Akira e Takeda, 2004).

O complexo IRAK1-TRAF6 desliga-se do receptor e interage na membrana plasmática com outro complexo pré-formado que inclui a quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β (TAK1), a proteína 1 ligadora da TAK1 (TAB1) e a proteína 2 ligadora da TAK1 (TAB2) ou a proteína 3 ligadora da TAK1 (TAB3). Esta interação induz a fosforilação da TAB2/TAB3 e da TAK1, que se desloca em conjunto com o TRAF6 e TAB1 para o citoplasma. A TAK1 é ativada por fosforilação no citoplasma, possibilitando a ativação de proteínas pertencentes a diferentes vias como as do IKK/ κ B/NF κ B e JNK, permitindo a translocação do NF κ B para o núcleo, levando à ativação de genes ligados a

resposta inflamatória, as quais induzem resistência à ação da leptina e insulina, sendo este o evento que melhor ilustra a disfunção hipotalâmica na obesidade, como representado na Figura 5.

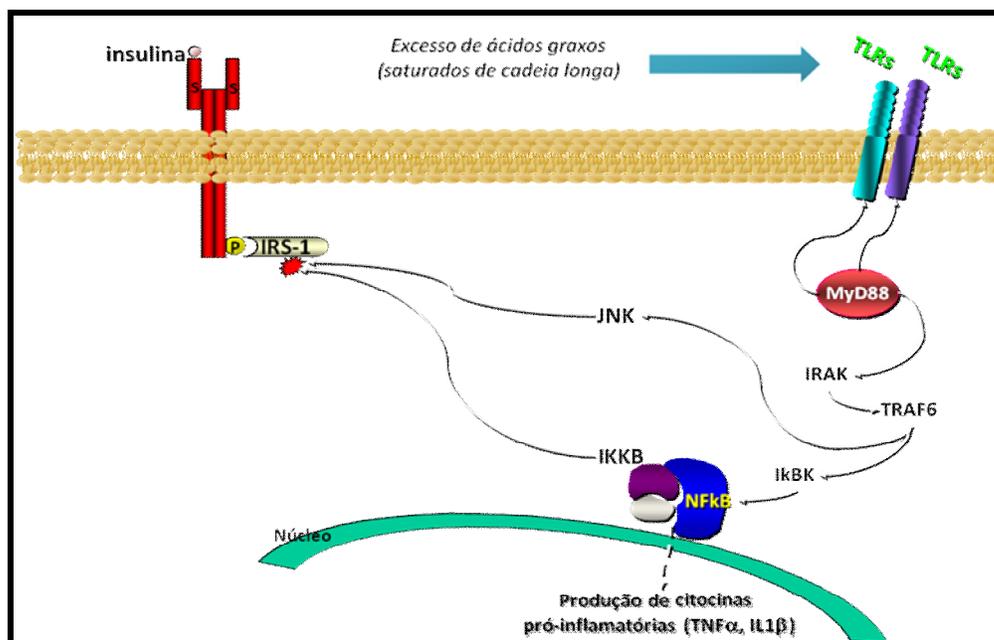


Figura 5: Via de sinalização Inflamatória e resistência a insulina através do *toll-like receptors*, induzida por lipídios.

Embora já esteja bem estabelecida a ligação da obesidade e diabetes tipo 2 a um estado inflamatório crônico, ainda há dúvidas em relação as etapas iniciais de sinalização celular que desencadeiam e determinam este estado. Apesar de muitos estudos comprovarem o aumento da expressão de IL1β na inflamação hipotalâmica, pouco se sabe sobre a ativação e participação da IL1β neste contexto.

1.4 A interleucina 1 beta

A interleucina 1 beta (IL1 β) é um dos membros de uma grande família gênica chamada de IL1, a qual também pertence pelo menos 11 membros conhecidos (IL-1F1-11), interagindo com proteínas do receptor IL-1 IL-1R1-9 ou proteínas relacionadas (Arend et al, 2008;. Dinarello, 2009; O'Neill, 2008). A IL1 β é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, junto com outras moléculas de atividade semelhante, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 8 (IL8), podendo induzir a inflamação aguda, em resposta à infecções ou danos teciduais.

A interleucina 1 é liberada no início da resposta imune e inicia uma cascata de eventos, a fim de neutralizar as consequências dos insultos. Monócitos ativados e as células da micróglia são os principais produtores de IL1 β na periferia e no sistema nervoso, respectivamente. Sua produção também foi documentada em neurônios, astrócitos e perícitos (Dinarello, 1994). Em condições normais, os níveis de IL1 são baixos, tanto na circulação quanto no sistema nervoso central, no entanto, a IL1 se liga aos seus receptores com alta afinidade, e baixas concentrações são necessárias para uma resposta biológica (Spulber, 2010).

A IL1 β é sintetizada como uma proteína precursora de 31 kDa, sendo clivada por proteases específicas, como a caspase-1, em sua forma ativa e secretada de 17 kDa. A IL1 β ativada pode se ligar as formas solúveis ou transmembranas dos receptores tipo I e tipo II (IL1RI ou IL1R1 e IL1RII ou IL1R2). Para que a IL1 β exerça sua atividade ela precisa se ligar ao receptor transmembrana IL1R1, e este deve interagir com a proteína acessória do IL1R (IL-1RAcP), para que a transdução do sinal ocorra (Spulber, 2010). Esta interação irá recrutar a molécula adaptadora MyD88, sendo responsável pela ativação

de diferentes vias de sinalização inflamatórias (Spulber, 2010 e Rothwell e Luheshi, 2000), como citado anteriormente e representado pela Figura 6 .

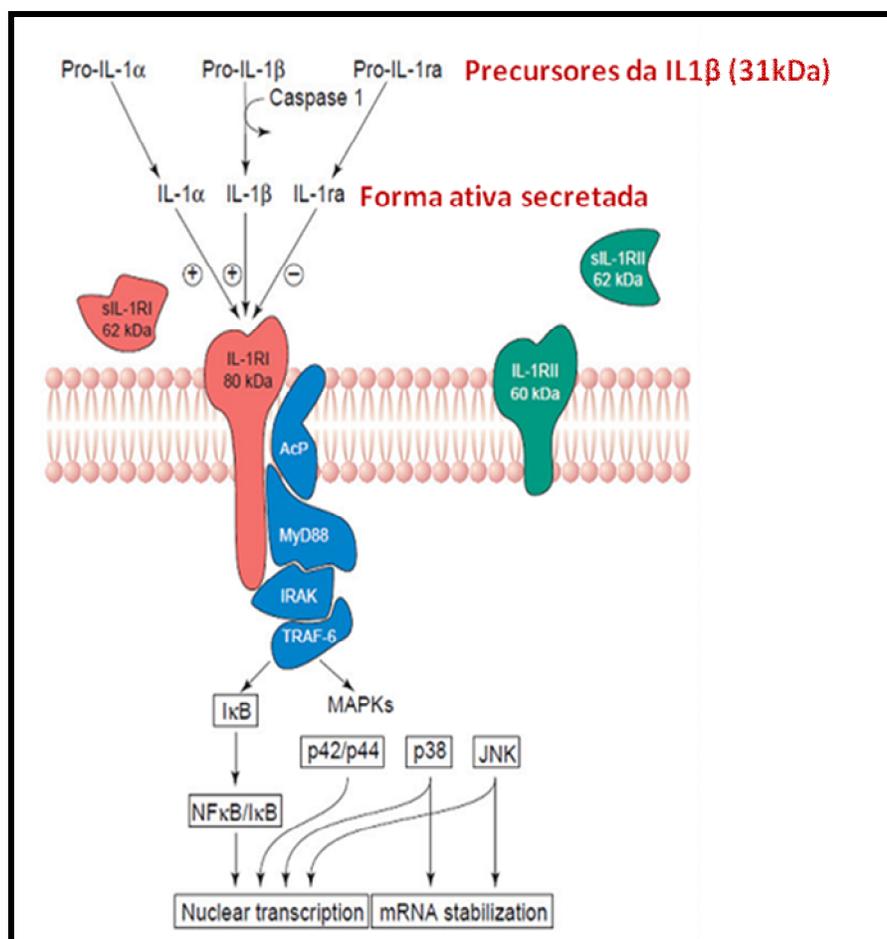


Figura 6- Via de sinalização da IL1β, incluindo seus receptores e antagonista. (Rothwell e Luheshi, 2000).

A proteína solúvel IL1RII (SIL-1RII) é um dos fatores de regulação da atividade da IL1, já que a IL1β uma vez ligada a este receptor não consegue transduzir seu sinal. A atividade de IL1β é também inibida por um antagonista do receptor endógeno, IL1ra, que ao se ligar a IL1RI impede a interação com a proteína acessória IL1RAcP. A existência destes dois reguladores endógenos da bioatividade da IL-1 enfatiza a potência desta citocina e a necessidade de controlar as suas ações (Spulber, 2010).

A IL1 β assim, como a IL1 α , tem sua atividade agonista ligando-se sobre o mesmo receptor, porém a IL1 α tem baixa afinidade ao receptor e está mais envolvida com a regulação intracelular (Lonnemann et al., 1989). Desta forma a resposta da IL1 β pode ser controlada por diferentes mecanismos, como a razão da abundância dos receptores, a concentração dos agonistas IL1 α e IL1 β e do antagonista IL1ra e ainda do processamento destas moléculas para apresentar sua atividade.

1.5 **A interleucina 1 beta no SNC.**

O SNC possui a barreira hematoencefálica e um sistema imune relativamente privilegiado, que são indispensáveis para limitar o dano durante a inflamação e para a manutenção de um microambiente precisamente regulado, permitindo assim uma atividade neuronal segura, ou seja, livre de agentes e partículas indesejáveis (Kim et al., 2006). No entanto, recentemente surgiram evidências de que o cérebro e outras partes do sistema nervoso são capazes de montar uma resposta inflamatória, comprovando que o privilégio imune não é a ausência total de componentes imunológicos, mas sim sua regulação elaborada (Galea et al., 2007).

Atualmente, se aceita que certas células no sistema nervoso podem responder a diferentes tipos de estresse, ferimento, incluindo a produção e liberação de moléculas inflamatórias, tais como citocinas. Dentre estas células, principalmente as micróglia são capazes de produzir e secretar fatores inflamatórios em resposta a diferentes estímulos estressantes (Spulber, 2010).

A IL1 β é um destes fatores inflamatórios que ao se ligar aos seus receptores no cérebro induz febre, bem como profundas alterações de comportamento, que foram

agrupadas sob o nome genérico de "*sickness syndrome*" (Dantzer e Kelley, 2007). Esta síndrome é uma organizada resposta adaptativa não-específica, composta de uma depressão global do comportamento locomotor, anorexia, hipersonia, diminuição da interação social e sexual, bem como alteração transitória nas funções cognitivas e depressão (Dantzer et al., 2008). A atividade pirogênica e outras ações da IL1 β levam aos sintomas de doença que são mediados centralmente através de receptores no hipotálamo, principalmente pelos neurônios sensíveis à temperatura na área medial pré-óptica (Besedovsky e Delrey, 1996).

Numerosos estudos nos quais se utilizaram LPS ou IL1 desvendaram a existência de um sistema de *feed-back* negativo na qual a ativação do sistema imune leva à estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), proporcionando uma modulação da resposta imune (Besedovsky et al. 1986 veja Besedovsky e Delrey, 1996). Assim, LPS, via IL1, dá origem a aumento da síntese e liberação do fator liberador da corticotropina (CRF) do núcleo paraventricular do hipotálamo, que por sua vez estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir do córtex adrenal.

A ocorrência de receptores de IL1 na glândula adrenal sugere a existência de uma regulação local desta citocina, talvez pelo seu antagonista IL1ra (Schultzberg et al., 1995). Estudos recentes têm fornecido evidências consistentes a respeito da existência de um circuito de sinalização autócrina na glândula adrenal, sugerindo um mecanismo pelo qual os agentes inflamatórios sistêmicos ativam um circuito intrinsecamente regulado de sinalização local que possam influenciar a resposta da adrenal ao estresse imunológico (Engstrom et al., 2008).

Notavelmente, a administração central e periférica de IL1 induz a liberação de noradrenalina no cérebro, mais acentuadamente no hipotálamo, embora os efeitos da IL1 sobre a serotonina e a dopamina tenham sido encontrados de forma menos acentuada (Kabiersch et al., 1988, Dunn, 2006). Estudos em ratos com superexpressão central da IL1ra indicam um papel da IL1 na sinalização mediada por receptores no metabolismo das catecolaminas (Oprica et al., 2005).

O envelhecimento normal do cérebro é caracterizado por um aumento nos níveis basais de citocinas pró-inflamatórias, bem como do estresse oxidativo devido a um aumento na produção de radicais livres e uma diminuição na atividade dos sistemas de defesa anti-oxidante. Fenômenos semelhantes têm sido descritos em linhagens de camundongos com o fenótipo de senescência acelerada (Butterfield e Poon, 2005; Trifunovic et al., 2004). A neuroinflamação e o aumento da produção e liberação de IL1 e outras citocinas estão associados ao envelhecimento e relacionadas com doenças neurodegenerativas crônicas, por exemplo, Alzheimer e doença de Parkinson.

Células da glia isoladas de cérebros de pacientes idosos são caracterizadas por um desequilíbrio entre as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, levando a um perfil pró-inflamatório e a reações exageradas a estímulos inflamatórios (Ye e Johnson, 1999, 2001). Frente a estas informações, tem sido sugerido que o envelhecimento associado à neuroinflamação crônica mantém a célula da micróglia em um estado "condicionado" (Dilger e Johnson, 2008; Sparkman e Johnson, 2008), o que poderia explicar a resposta exagerada e prolongada (Godbout et al., 2005; Kinoshita et al. 2009, para revisão ver Dilger e Johnson, 2008). O papel causal da IL1 em neurodegeneração é apoiado por estudos em que o antagonista IL1ra tem sido

administrado ou superexpresso. Dessa forma, o aumento da expressão do IL1ra no cérebro por meio de transfecção adenoviral (Betz et al., 1995; Yang et al., 1998), gera uma condição de neuroproteção em modelos animais de isquemia cerebral.

A administração de IL1ra reduziu significativamente a isquemia, a excitotoxicidade, traumas ou lesões cerebrais em roedores quando injetado por via intracerebroventricular (ICV) ou periféricamente (Garcia et al., 1995). O bloqueio dos receptores de IL1 facilita a recuperação após lesões no cérebro (Tehrani et al., 2002). Existem ainda evidências de que a IL1 seria um fator de crescimento importante no desenvolvimento do sistema nervoso (Giulian et al., 1988). Baixos níveis endógenos de IL1 parecem ser essenciais para a sobrevivência dos neurônios embrionários (Brenneman et al., 1992). A importância da sinalização de IL1 para o cérebro em desenvolvimento é ressaltada pela sua expressão precoce, no décimo segundo dia embrionário no rato (Mano et al., 2007).

Estudos *in vitro* mostraram que a IL1 β promove a proliferação de células progenitoras embrionárias mesencefálicas de ratos (Akaneya et al., 1995; Carvey et al., 2001), bem como estimula a diferenciação de células precursoras fetais mesencefálicas de neurônios dopaminérgicos em ratos e seres humanos (Carvey et al., 2001; Johansson e Stromberg, de 2002; Ling et al., 1998; Riaz et al., 2004; Storch et al., 2001). Curiosamente, a IL1 estimula o desenvolvimento de axônios dopaminérgicos na sequência de uma lesão (Parish et al., 2002). A indução de diferenciação neuronal também foi observada em culturas de células humanas do epitélio neuro-olfativo (Vawter et al., 1996).

Assim, com base na literatura, aventamos a hipótese de que a IL 1β desempenha um papel inflamatório importante, contribuindo para a disfunção hipotalâmica na obesidade.

1.6 O papel do tecido adiposo marrom e do músculo esquelético na termogênese

Ao longo das duas últimas décadas, a visão clássica de que o tecido adiposo era considerado um armazém passivo para o excesso de calorias tem mudado dramaticamente. O tecido adiposo é hoje considerado um órgão endócrino ativo, liberando uma variedade de peptídeos e outras substâncias, como ácidos graxos livres (FFA), leptina, adiponectina, TNF α , IL6 e retinol ligado a proteína 4 (RBP-4), os quais podem agir em outros tecidos, incluindo o cérebro, fígado, músculo, bem como em outros adipócitos para regular a ingestão de alimentos, balanço energético e sensibilidade à insulina (Cypess,2010).

Na obesidade há um acúmulo excessivo de lipídeos na forma de triglicérides (TG) em vários sítios anatômicos que diferem em muitos aspectos, principalmente se eles são compostos por adipócitos brancos ou marrons. Estes dois tipos distintos de adipócitos diferem em seu conteúdo lipídico e funções metabólicas. O tecido adiposo branco (WAT) tem a função primária de armazenamento de lipídios, no estado alimentado e em jejum libera ácidos graxos da quebra de TG na circulação para a produção de energia muscular e gliconeogênese a partir do glicerol. Em contraste, o tecido adiposo marrom (BAT) tem estoques de TG mais limitado e não secretam ácidos graxos, e sim usam os TG para gasto de energia autônomo e para a geração de calor (Singh R et al, 2009).

A distribuição do tecido adiposo branco (WAT) afeta muito o risco metabólico, sendo que o aumento da gordura abdominal/visceral está associado ao risco elevado de doença metabólica, enquanto o aumento da gordura subcutânea nas coxas e quadris exerce pouco ou nenhum risco de doença metabólica. Evidências recentes indicam que essas diferenças funcionais podem ser desenvolvidas na origem (Gesta, 2007) e no grau de infiltração desses diferentes depósitos de gordura com outras células, liberando citocinas que contribuem para a resistência a insulina vista na obesidade (Arkan, 2005). O órgão adiposo nos roedores é composto de uma série de depósitos de WAT, mas apenas um depósito principal de BAT que está concentrada na área interescapular. No entanto, pequenas coleções de BAT foram identificadas em outras áreas, inclusive misturado com WAT e intercalado entre feixes de músculo esquelético (Almind, 2007; Xue, 2007).

Já em seres humanos, vários estudos publicados em 2009 mudaram nossa compreensão da localização e do papel potencial dos depósitos do BAT (Cypess, 2010). Anteriormente acreditava-se que os seres humanos adultos poderiam ter pequenas bolsas de BAT e inúmeras tentativas de encontrar BAT funcional durante a vida ou utilizar a sua termogênese para perda de peso não tiveram sucesso, sendo por muitos anos considerado biologicamente irrelevante em humanos adultos. Acreditava-se que este tecido correspondia à apenas 0,3% da massa corpórea (Block, 1994), o que tornava sua participação na termogênese pouco relevante (Argyropoulos, 2002).

Os avanços na caracterização do BAT em humanos se iniciaram com estudos de cinco grupos independentes que utilizaram PET/CT. Todos os cinco grupos mostraram grandes depósitos de gordura metabolicamente ativa na região cervical supraclavicular

e em algumas pessoas na região torácica, que apresentavam UCP1 e características histológicas de BAT. Virtanen e seus colaboradores em 2009 também demonstraram a expressão de UCP1, DIO2 e do receptor beta3-adrenérgico, indicando a capacidade de resposta potencial do BAT de humanos com ambos os estímulos hormonais e farmacológicos (Virtanen, 2009).

O principal mecanismo responsável pela termogênese no BAT é a ativação da proteína desacopladora mitocondrial (UCP1). Esta proteína, presente na membrana interna das mitocôndrias, promove uma rota alternativa para o retorno dos prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, colapsando o gradiente de prótons e desacoplando o consumo de oxigênio da síntese de ATP (Cannon, 2004).

Em humanos adultos assim como em roedores a produção de calor também é atribuída ao músculo esquelético, uma vez que este representa aproximadamente 40% do peso corporal, possui alta atividade metabólica e grande capacidade de responder rapidamente a estímulos nervosos (Block, 1994). Os mecanismos que regulam a termogênese adaptativa no músculo esquelético ainda não estão totalmente esclarecidos. Um processo de grande relevância é o consumo de ATP no transporte de cátions e manutenção de gradientes iônicos realizado pelas ATPases (Silva, 2006; Kopecky, 1995). Isso por que a termodinâmica da reação de hidrólise de ATP não é 100% eficiente, sendo parte da energia de hidrólise convertida em calor.

Além disso, a hidrólise contínua de ATP estimula a fosforilação oxidativa mitocondrial necessária para manter os níveis fisiológicos de ATP. Esse fenômeno também contribui para o aumento da dissipação de calor (Silva, 2006; Kopecky, 1995). Em repouso, a atividade da Na^+/K^+ e a Ca^{2+} -ATPase representa 10 a 20% do

metabolismo do tecido muscular. Entretanto, durante a contração muscular a taxa metabólica aumenta muito, sendo que somente a Ca^{2+} -ATPase contribui com cerca de 24% (músculo vermelho) a 58% (músculo branco) da taxa metabólica do músculo (Seale, 2008).

A produção de calor pelas mitocôndrias do músculo esquelético parece também ser relevante, uma vez que em animais expostos ao frio há um aumento da biogênese e da respiração mitocondrial. No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre produção de calor nestas mitocôndrias não está elucidado. Embora nas mitocôndrias ocorra a expressão de uma isoforma da UCP, a UCP3, o envolvimento desta em termogênese é controverso (Cadenas, 1999). Dentre as evidências que indicam que a UCP3 possa ter alguma participação na termogênese muscular, está o fato da UCP3 estar aumentada após administração de *Ecstasy*, derivado da anfetamina que promove hipertermia (Mills, 2003) e que a superexpressão desta proteína protege contra a obesidade gerada por dieta (Choi, 2007). Por outro lado, o mRNA da UCP3 está aumentado em animais em jejum embora haja uma diminuição na termogênese e animais knockout para a UCP3 tem resposta normal ao frio e não são obesos (Gong, 2000).

O controle da expressão dos genes das UCPs é pouco conhecido. Estudos recentes revelaram que a proteína denominada coativador1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1alfa) desempenha papel fundamental nesta regulação (Puigserver, 1998). Tanto no BAT quanto no músculo esquelético vermelho, a exposição ao frio promove aumento da expressão de PGC-1alfa (Boss, 1999; Ueda, 2005). A expressão ectópica de PGC-1alfa em células do BAT ativa a expressão da UCP1 e das principais enzimas mitocôndrias da cadeia respiratória, como os fatores

respiratórios nucleares (NRFs), além de aumentar o conteúdo do DNA mitocondrial (Spiegelman, 2001). Estes resultados indicam que o PGC-1 α desempenha papel chave na biogênese mitocondrial e na termogênese mediada por esta organela (Fig. 7).

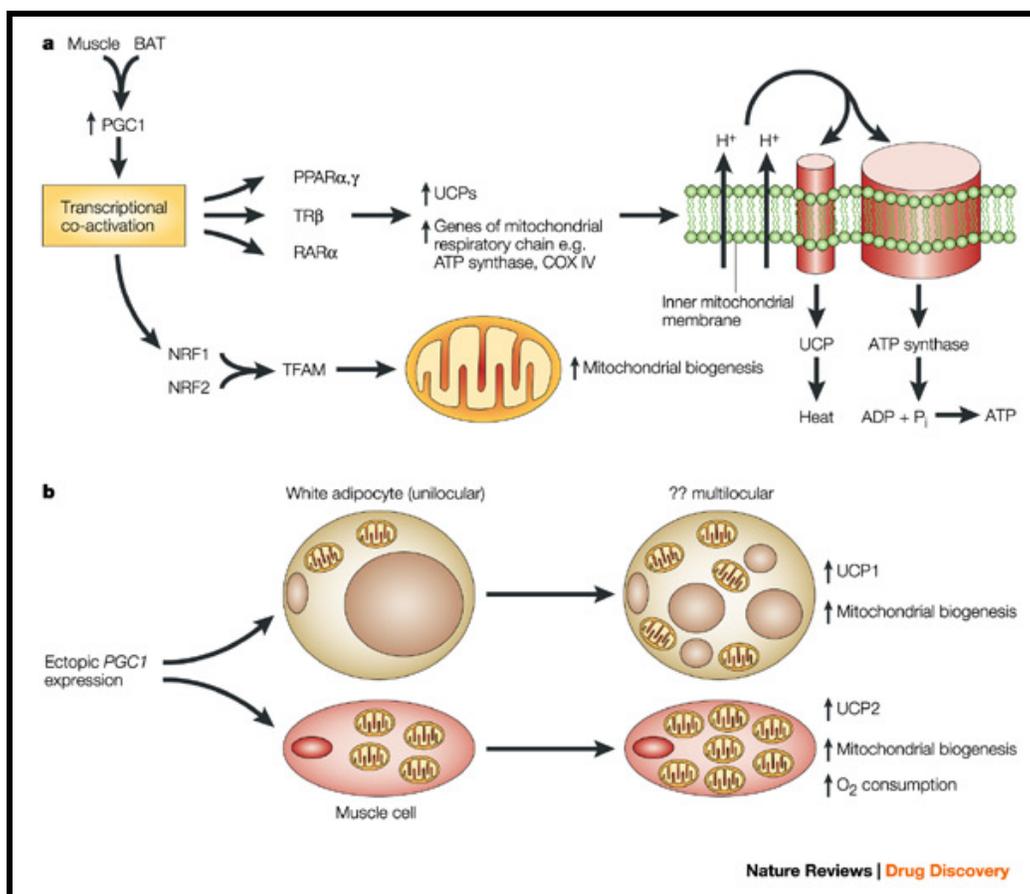


Figura 7: Em músculo e tecido adiposo marrom (BAT) a expressão endógena de PGC1 α desempenha papel importante na co-ativação de fatores de transcrição que controlam a biogênese mitocondrial, UCPs e genes da cadeia respiratória (a). O papel importante da PGC1 α neste contexto é reforçado pelo fato de que sua hiperexpressão leva a um aumento do número de mitocôndrias e de UCPs em tecido adiposo e músculo (b).

1.7 A técnica de interferência por RNA (RNAi)

Com o advento do sequenciamento gênico em larga escala, milhares de genes foram identificados, muitos dos quais possuem função ainda desconhecida. Dentre as estratégias para se desvendar a função de um determinado gene estão os métodos que

levam a uma redução da expressão gênica. Esta abordagem consiste em impedir que o gene estudado gere a proteína por ele codificada com o propósito de analisar as consequências ou o fenótipo decorrente desta inibição em organismo inteiro ou em células cultivadas. A partir destas informações, pode-se deduzir a função do gene inativado, bem como as vias de sinalização a que pertence o produto deste gene (Barbosa, 2004). Dentre as abordagens de perda de função gênica, a técnica de interferência por RNA (RNAi) tem sido amplamente utilizada.

A RNAi promove o silenciamento gênico potente e específico através da introdução de moléculas de RNA dupla-fita (double stranded RNA, dsRNA) (Fire et al., 1998). Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez por um grupo de pesquisadores que estudavam a função de genes do nematódea *Caenorhabditis elegans* utilizando a técnica de RNA anti-senso, que consiste na inoculação de moléculas longas de RNA simples-fita, complementares ao RNA alvo. Esses pesquisadores, além de testarem as moléculas anti-senso, também fizeram injeção de uma mistura de moléculas senso e anti-senso nos vermes, observando que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) eram capazes de abolir a expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA, descobrindo um silenciamento cem vezes mais efetivo do que utilizando somente o oligo anti-senso (Fire et al., 1998). Hoje sabemos que, potencialmente, qualquer gene pode ser silenciado em células de mamíferos cultivadas, insetos, plantas e fungos.

A interferência mediada por RNA hoje utilizada como ferramenta para manipulação gênica e até de forma terapêutica, é uma via natural de defesa conhecida como silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Hannon, 2002). Esta via esta presente

normalmente nas células da maioria dos organismos eucariotos e parece exercer, primordialmente, um papel na eliminação de RNAs mensageiros anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus (Tabara H, et al., 1999; Ketting RF, et al, 1999). A RNAi possui um papel importante na proteção do genoma, como sugerido por mutantes de *C. elegans* que não apresentam esse mecanismo de silenciamento e que, em consequência, têm uma alta frequência de mutações espontâneas em decorrência da maior mobilidade de transposons endógenos (Tabara H, et al., 1999; Ketting RF, et al, 1999).

A forma sintética da RNAi utiliza siRNAs que possuem um grupo fosfato nas extremidades 5' e dois nucleotídeos não pareados nas extremidades 3', características que definem sua assinatura molecular (Hannon, 2002). Dentro das células, as dsRNAs longas são clivadas em vários siRNAs por ação de uma enzima chamada Dicer (Elbashir *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2001). Em seguida, o siRNA é capturado por R2D2, uma proteína acoplada a Dicer com afinidade por duplexes de RNA. R2D2 age como um sensor da estabilidade termodinâmica das extremidades do siRNA (Tomari *et al.*, 2004). Desta forma, esta proteína liga-se ao oligonucleotídeo do duplex cuja extremidade 5' é mais estável termodinamicamente (oligo passageiro).

Posteriormente, uma proteína com atividade de RNA Helicase, Dicer ou alguma outra proteína específica (Dalmay *et al.*, 2001), abre o duplex e o outro oligonucleotídeo, com extremidade 5' menos estável (oligo guia), é preferencialmente transferido para a endonuclease Slicer (ou Argonata 2), responsável pela clivagem do mRNA alvo, promovendo o silenciamento gênico (Hammond *et al.*, 2000). Esta proteína e muitas outras constituem o complexo enzimático designado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) (Hammond *et al.*, 2000). O oligo guia permanece intacto e associado ao

complexo, permitindo sua utilização na clivagem de, no mínimo, mais outras nove moléculas de RNA (Hutvagner & Zamore, 2002). Os produtos gerados na clivagem são degradados por exonucleases presentes na célula (Glazov *et al.*, 2003) (Fig. 8).

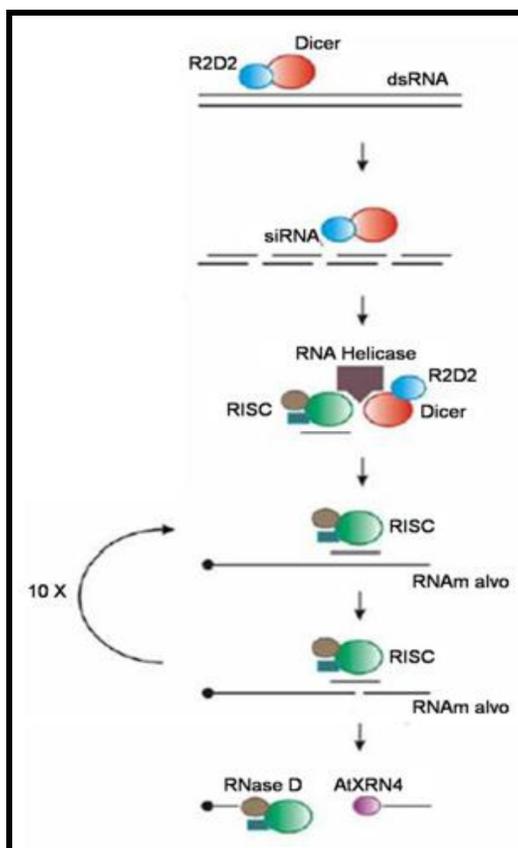


Figura 8: Esquema do mecanismo funcional do silenciamento gênico por RNAi.

Em mamíferos, a técnica de RNAi é mediada por dsRNAs de 21 nucleotídeos, os quais possuem as mesmas características moleculares do produto de clivagem de longas dsRNAs pela enzima Dicer, sendo designados portanto *small interfering RNAs* (siRNAs) (Elbashir *et al.*, 2001). Quando moléculas de dsRNAs maiores que 30pb são introduzidas em células de mamíferos, ativam a via da proteína Kinase R dependente de dsRNA (PKR), levando a uma resposta mediada por interferon que, ao invés de resultar em silenciamento gênico, leva à morte celular (Elbashir *et al.*, 2001).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Avaliar as repercussões da inibição da IL1 β no hipotálamo sobre a ingestão alimentar e o gasto energético em obesidade induzida por dieta.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o padrão de expressão da IL1 β em modelo de obesidade induzida por dieta;
- Avaliar o perfil inflamatório hipotalâmico bem como ingestão alimentar e peso corporal do modelo de inibição da IL1 β com siRNA;
- Quantificar alguns marcadores de termogênese no tecido adiposo marrom e músculo esquelético de animais submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com siRNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Modelo animal. Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar, machos, obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP com 4 semanas de vida e mantidos em gaiolas individuais, climatizadas, em ciclo claro-escuro de 12 hs. Quando atingiram 8 semanas de vida, os animais foram alimentados durante 4 semanas com dieta controle ou dieta hiperlipídica e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP, seguindo as orientações da universidade para a utilização de animais em estudos experimentais e em conformidade com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo National Institutes of Health dos EUA (NIH publicação n° 85-23 revista em 1996).

Tabela 1. Composição das dietas

Composição	Controle	Hiperlipídica rica em saturados
Amido (Q.S.P)	467,5	115,5
Caseína	200	200
Amido de Milho Dextrinizado	132	132
Sacarose	100	100
Óleo de Soja	40	40
Óleo de Linhaça	0	0
Óleo Azeite	0	0
Banha	0	312
Celulose microfina (Fibra)	50	50
Mix Minerais	35	35
Mix Vitaminas	10	10
L-Cistina	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Total	1000	1000

3.2 Protocolos experimentais

Grupos Experimentais. No experimento para o silenciamento de genes alvos, foram utilizados ratos mantidos com dieta rica em ácidos graxos saturados, de acordo com a Tabela 1. Estes animais foram randomicamente divididos em 3 grupos, sendo eles: grupo controle; grupo silenciado o Gene GFP e grupo silenciado IL1 β .

No experimento de dose resposta da IL1 β os animais experimentais foram submetidos à canulação intracerebroventricular (icv) e após verificar o correto posicionamento da cânula (conforme descrito abaixo), os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos, sendo eles: grupo controle, grupo tratado com IL1 β 10⁻⁶, grupo tratado com IL1 β 10⁻⁸, grupo tratado com IL1 β 10⁻¹⁰ e grupo tratado com IL1 β 10⁻¹². Todos os grupos receberam dieta controle de acordo com a Tabela 1.

Avaliação dos Parâmetros Metabólicos. Nos dois grupos experimentais, durante todo o tratamento foram avaliados a ingestão alimentar, ganho de peso e temperatura dos animais. A avaliação da ingestão alimentar, foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola todos os dias as 9:00 horas, uma hora antes do início dos tratamentos. O ganho de peso foi determinado pela pesagem em gramas dos animais as 18:00 horas e a temperatura corpórea foi aferida em graus *Celsius* também as 18:00 horas.

Calorimetria indireta e atividade física espontânea. Nos animais com o silenciamento de genes alvos, foram avaliados o consumo de O₂, a liberação de CO₂, razão de troca respiratória (RER) e atividade física espontânea (SPA) através de um circuito aberto de calorimetria indireto (Harvard Apparatus, Hollistone, MA, EUA). SPA foi determinada em dois eixos horizontais, fornecendo informações sobre a motilidade linear.

Algoritmo para desenho das moléculas interferentes. Muitos trabalhos na literatura apresentam siRNAs com graus de eficiência bem diferentes. O desenho de siRNAs não se limita única e exclusivamente a escolher uma sequência qualquer de 21 nucleotídeos baseado na sequência do RNA mensageiro. Alguns dos vários parâmetros que determinam essa eficiência são conhecidos. A identificação de alvos para RNAi foi baseada no protocolo de Thomas Tuschl (Elbashir et. al., 2001; <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) com algumas modificações. Resumidamente, escolhemos a sequências com as seguintes características:

- O alvo deve estar localizado na região codificante, excluindo os 100 primeiros nucleotídeos após o start codon e os 100 últimos nucleotídeos antes do stop codon. Isso devido à possibilidade dessas regiões estarem complexadas a proteínas regulatórias da tradução, dificultando o acesso do siRNA. 5' e 3' untranslated regions (UTR) geralmente não são consideradas devido à mesma questão.
- Conteúdo de GC entre 30% e 55%
- Sabe-se que siRNA que apresentam TT nas extremidade 3' são mais estáveis
- Análise da energia livre das duas extremidades dos siRNAs, que será realizada pelo programa *Strand Analysis* desenvolvido no nosso laboratório (Pereira et al., 2007).
- Não apresentar estruturas secundárias (*hairpins*, duplexes ou *loops*). Essa análise é conduzida no programa *Gene Runner*, subprograma *oligo*, sempre trabalhando com o formato RNA da sequência.
- Não apresentar identidade com nenhuma outra sequência no genoma, sendo que mesmo identidades baixas como 16/21 não serão aceitas.

A busca por identidade foi realizada através do programa *Strand Analysis to Blast* (<http://lgm.fcm.unicamp.br:9001/cgi-bin/SA/SA2blast.cgi>) usando sempre o oligo anti-

senso do siRNA (que é a molécula funcional) contra o banco EST (sequências expressas) do organismo em questão. Sabe-se que a clivagem do RNA alvo por *slicer* ocorre quando há um pareamento perfeito do oligo anti-senso com o alvo (100% de complementaridade). A existência de apenas um *mismatch* reduz drasticamente a atividade de *slicer* (menos de 10%), prejudicando o silenciamento gênico. Mesmo assim, o padrão de busca aceita sequências que possuam complementaridade menor que 16 nucleotídeos com outro gene evitando assim silenciamento inespecífico.

As sequências escolhidas contra os genes IL1 β e Il1ra foram sintetizadas quimicamente pela empresa IDT (Coralville, Iowa; USA), cada fita de RNA foi sintetizadas independentemente no laboratório foram ressuspendidas em H₂O Miliq em 100 μ M. Após esse procedimento o mesmo volume das fitas senso e anti-senso de cada gene, foi misturada e mantida a 95°C por 5 minutos, posteriormente foram mantidas em ambiente isolado termicamente para propiciar a queda gradual e lenta da temperatura por 30 minutos. Os siRNAs foram estocados a -80°C até sua utilização nos experimentos.

Sequência dos siRNAs utilizados: *siIl1 β* sense: 5' UGACCCAUGUGAGCUGAAAGC 3'
; *siIl1b* anti-sense: 5' UUUCAGCUCACAUGGGUCAGA 3'; *siGFP* sense:
5'CAGGCUACUUGGAGUGUAUUU 3'; *siGFP* anti-sense: 5' AUACACUCCAAGUAGCCUGUU 3'

Transfecção dos siRNAs no SNC. Para a entrega das moléculas de siRNAs no SNC dos animais, nós baseamos em um método de transfecção proposto por Kumar e seus colaboradores em 2007, utilizando os siRNAs complexados com um peptídeo derivado da sequência do capsídeo do vírus da raiva (RVG-9dR), que promove boas taxas de transfecção devido ao alto neurotropismo deste peptídeo, transportando os siRNAs através da barreira hematoencefálica (BHE) possibilitando a transfecção de células no sistema nervoso central. O peptídeo (*RVG9R*, YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGRRRRR

RRRR) foi sintetizado e purificado por cromatografia líquida de alta performance pela *Biosynthesis* (Lewisville, Texas; USA).

Administração do complexo siRNA:RVG por injeção intravenosa na veia caudal.

Animais de cada grupo experimental receberam uma injeção diária intravenosa (veia caudal) de salina ou do complexo siRNA:RVG para cada gene específico. Foram utilizadas doses de 25 ou 50 µg de siRNA por injeção durante 11 dias, sendo diluído em PBS com 5% de glicose em um volume final de 500 microlitros por injeção. Os siRNAs alvos foram conjugados 15 minutos antes com o peptídeo RVG-9R em uma razão molar de 1:10, siRNA:RVG, e mantidos em temperatura ambiente.

Para identificar as melhores condições experimentais (concentrações e número de injeções do siRNA). Foram avaliadas doses de 25-50 µg de siRNA por injeção, em uma ou duas injeções diárias em um intervalo de 8 horas. Os cérebros foram coletados nos pontos de tempo: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h após a primeira injeção de siRNA, a fim de caracterizar o curso de tempo de silenciamento da IL1β. Para avaliar o efeito de silenciamento em diferentes áreas anatômicas, o cérebro foi dividido em seis regiões da seguinte forma: o hipocampo, córtex frontal, bulbo olfatório, cerebelo, tronco cerebral e no hipotálamo.

Cirurgia Estereotáxica. Quando necessário os animais foram submetidos à canulação do ventrículo lateral. Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de diazepam (Compaz®, 1,25 mg/Kg) / cloridrato de xilazina (Kenzol®, 15 mg/Kg) / cloridrato de s+ cetamina (Ketamin®-s+, 75mg/Kg). Depois de testados os reflexos corneano, pedioso e caudal os animais foram posicionados no aparelho de estereotaxia Stoelting para o implante de uma cânula no ventrículo lateral do hipotálamo, seguindo as coordenadas do atlas Paxinos-Watson (Paxinos et al, 1980). Após

este procedimento cirúrgico os animais receberam analgesia durante três dias com paracetamol (3 gotas diluídas em 250mL de água).

Infusão Intracerebroventricular. Após o período de uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a um teste de resposta a ingestão hídrica, decorrente do tratamento com angiotensina II (2,0μL de solução 10⁻⁶M), o qual avalia o correto posicionamento da cânula. Ratos com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados e utilizados nos experimentos. Para infusão intracerebroventricular foi utilizada uma seringa Hamilton (50μL) acoplada, por meio de uma cânula plástica, a uma agulha 30G, de modo que esta ultrapassasse o comprimento da cânula metálica (0,1 – 0,2mm) garantindo a entrada do líquido no ventrículo lateral. Animais de cada grupo (experimento dose resposta IL1 β) receberam 2,0μL ICV de salina, e diferentes doses de IL1β nas concentrações já descritas, uma vez ao dia durante 7 dias.

Dissecção dos tecidos. Após os tratamentos descritos anteriormente os animais foram sacrificados através do aprofundamento anestésico com a administração intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax®, 40-60mg/kg). Após a extração dos tecidos, os mesmos foram homogeneizado em aproximadamente 10 volumes de Trizol ou em 10 volumes de tampão de solubilização (Triton X-100; 100mM Tris ph 7,4; contendo 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio; 10mM de vanadato de sódio; 2mM PMSF e 0,1mg de aprotinina/ml) a 4° C em "Politron PTA 20S generator" (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos.

O homogeneizado com tampão de solubilização foi então centrifugado a 11.000 rpm por 30 minutos para remoção de material insolúvel. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteínas utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976).

Extração de RNA e síntese de cDNA. Amostras dos tecidos foram retiradas, e delas foi extraído RNA total segundo o protocolo sugerido pelo fabricante do Trizol (Invitrogen, Califórnia, USA). A confirmação do silenciamento em todos os experimentos por RNAi foi feita por PCR em Tempo Real, e quando julgamos necessário por Western Blot. A qualidade dos RNAs obtidos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com SYBR Safe (Invitrogen, Califórnia, USA).

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando a enzima *SuperScriptIII TM Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Califórnia, USA). Dois microgramas do RNA extraído foram incubados com 250ng de primers randômicos (Invitrogen, Califórnia, USA), 1µL de dNTP mix (10mM) e água para um volume de 14µL, a 65° C por 5 minutos, e então resfriado em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4µL de 5x *First-Strand Buffer*, 1µL de DTT (0,1M) e 50U da enzima *Superscript III RT*, sendo a amostra incubada a 25° C por 5 minutos, 50° C por 60 minutos e 70° C por 15 minutos.

PCR em Tempo Real. A expressão do mRNA de NPY, MCH, TRH e POMC foram medidos em cDNA de hipotálamo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica ou tratados com siRNA. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqManTM (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene GAPDH (TaqManTM - Applied Biosystems) foi utilizado como controle endógeno da reação. Os valores da expressão gênica foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems).

Western Blot. As amostras de tecido foram homogeneizadas em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização contendo 1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C em “Polytron PTA 20S Generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35, Westbury, NY, EUA) com velocidade máxima por 30 segundos. O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm a 4 °C em um rotor “Beckman 70,1”, por 30 minutos para remoção de material insolúvel. A proteína total do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford com leitura 595 nm em espectrofotômetro. Os extratos protéicos totais foram ressuspensos em tampão de Laemmli e aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese em gel SDS-PAGE (não desnaturante). As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD banhadas com tampão de transferência durante 2 horas a 120 Volts em gelo. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com um anticorpo específico (anticorpo anti-IL1B policlonal de coelho, #ARC0912, Biosource-Invitrogen CA, EUA; anticorpo Anti-IL1ra policlonal de coelho, SC-25444, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA, anticorpo anti β -actina monoclonal de coelho, # ab6276, Abcam, MA, EUA). A ligação do anticorpo às proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação das membranas de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02 % de Tween 20) por 2 horas. A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimiluminescência utilizando Syngene Gbox (Imgen Technologies, Alexandria, VA, EUA). As membranas foram expostas a filmes de RX Kodak a temperatura ambiente por períodos variados. Após a revelação das auto-radiografias as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica.

Atividade da citrato sintase. A atividade da citrato sintase foi determinada conforme descrito por Shepherd e Garland (1969). Fragmentos (1-3 mg) do músculo sóleo e do BAT foram homogeneizados em aproximadamente 10 volumes de tampão de reação de citrato sintase (Sacarose 125mM, KCl 65mM, HEPES 10mM, K₂HPO₄ 2mM, MgCl₂ 1mM e pH = 7.2) em "Politron PTA 20S generator" (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. Antes da adição do *cocktail* inibidor de protease (Sigma), alíquotas foram retiradas para a determinação da concentração de proteínas utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram então diluídas em tampão Tris-50 mM pH 7,4 a uma concentração final de aproximadamente 1 mg. Quatro a seis microgramas de proteínas das amostras foram adicionadas a uma microplaca antes de pipetar 250 µL de tampão de reação de citrato sintase. A cinética de absorção em 412 nm foi medida em um leitor de microplacas (PowerWave XS 2, Biotek) por 6 min. A atividade enzimática foi calculada como µmol de formação de citrato por minuto, e expressos por mg de proteína da amostra (U / mg).

Análise estatística e apresentação dos resultados. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média. Para análise estatística, primeiramente utilizamos o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Para a comparação de médias entre dois grupos, utilizamos o teste *t de Student* para amostras independentes. Quando necessário, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e seguido de teste *pos-hoc de Tukey* para comparação múltipla de médias. Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese nula foi $p < 0,05$.

4. CAPÍTULO 1 - ARTIGO

Article

Interleukin-1 β plays a thermogenic role in diet-induced hypothalamic inflammation

Livia B. Pascoal, Vinicius D. Pascoal, Marciane Milanski, Leticia M. Ignacio-Souza, Andressa Coope, Carina Malagutti, Iscia Lopes-Cendes, Licio A. Velloso

Laboratory of Cell Signaling and Department of Medical Genetics, University of Campinas, Brazil

To whom correspondence should be addressed:

L. A. Velloso, email: lavelloso.unicamp@gmail.com

Abstract

In experimental obesity, changes in hypothalamic function play an important role in the anomalous regulation of food intake and energy expenditure. Recent studies have shown that a low-grade hypothalamic inflammation is an important factor contributing to hypothalamic dysfunction in this context. Cytokines such as $TNF\alpha$, IL6 and IL10 have been studied in the hypothalamus of experimental models of obesity, however, the role played by IL1 β in this condition is unknown. Here we employed small-interference RNA conjugated with the rabies virus RVG-9R peptide to deliver an IL1 β antisense RNA to the central nervous system. This approach led to a 50% reduction of hypothalamic expression of IL1 β in obese rats and produced an increase in body mass gain without affecting food intake and spontaneous physical activity. Upon central nervous system IL1 β inhibition the brown adipose tissue activity of the respiratory chain mitochondria enzyme citrate synthase was reduced, while the expression of PGC1 α was increased. Thus, the expression of IL1 β in the hypothalamus of obese rats provides a brown adipose tissue-dependent thermogenic mechanism that protects against excessive body mass gain.

Introduction

Hypothalamic inflammation is a common feature of genetic and diet-induced experimental obesity (1, 2). Currently, five distinct intracellular inflammatory mechanisms are known to play a role in the defective hypothalamic activity in obesity: increased expression of SOCS3 (3); hyperactivity of the inflammatory kinases JNK and IKK (4, 5); increased expression of the tyrosine phosphatase PTP1B (6, 7); and, increased activity of PKC-theta (8). In all instances, genetic and/or pharmacological targeting of the inflammatory mediators leads to body mass reduction (3, 4, 6-8).

The activation of the intracellular mediators of inflammation in the hypothalamus of obese animals results from a complex, and incompletely elucidated combination of factors, which include, but probably are not restricted to; TLR4 and cytokine signaling (9), and endoplasmic reticulum stress (5, 9). Increased hypothalamic expression of pro-, and anti-inflammatory cytokines have been reported in different contexts of obesity and the particular roles of TNF α , IL6 and IL10 have been explored to some extent (3, 5). TNF α provides a low-grade inflammation which contributes to the installation of leptin and insulin resistance in the hypothalamus, resulting in an anti-thermogenic and orexigenic effect (10, 11). Conversely, both IL6 and IL10 act as anti-inflammatory factors, reducing the effects of diet-induced hypothalamic inflammation (12). IL1 β , is another canonical inflammatory cytokine which is increased in the hypothalamus of obese rodents (4). However, the role played by this cytokine in the hypothalamic dysfunction in obesity is virtually unknown.

Here, we explored the hypothesis that IL1 β would play an important low-grade, anti-thermogenic inflammatory role in the hypothalamus of obese animals. To our surprise, IL1 β acted to increase thermogenesis and its inhibition by siRNA resulted in body mass gain.

Materials and methods

Antibodies, chemicals and buffers. The reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride

(PMSF), aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (fraction V) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Nitrocellulose membrane (BA85, 0.2 μm) was from Amersham (Aylesbury, UK). Xylazine, ketamine and diazepam were from Cristalia (Itapira, Brazil). Thiopental was from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Anti-IL1 β antibody (rabbit polyclonal, #ARC0912) was from Biosource-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Anti-IL1ra antibody (rabbit polyclonal, sc-25444) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti β -actin (#ab6276, mouse monoclonal) was from Abcam (Cambridge, MA, USA).

Experimental model. In all experiments we employed male Wistar rats, which were fed *ad libitum* on regular (control, CT) or high-fat (HF) diets, for four weeks, beginning at eight weeks of life. The animals were maintained on a 12:12 h artificial light-dark cycle and housed in individual cages. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996). In the experimental animals submitted to intracerebroventricular (icv) cannulation, anesthesia was obtained by a combination of diazepam (1,25 mg/Kg)/xylazine (15 mg/Kg)/ketamine (75mg/Kg, 1.0 ml/400g body mass). For euthanasia, before tissue extraction, the rats were deeply anesthetized Thiopental (40-60mg/kg).

Peptides and siRNAs. RVG-9R peptide (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGRRRRRRRRR) was synthesized and purified by high-performance liquid chromatography at the Biosynthesis (Lewisville, TX, USA); the C-terminal nine arginine residues were D-arginine. siRNAs were designed against the endogenous IL1 β using *Strand Analysis* program (13). SiRNAs were purchased from IDT (Coralville, IA, USA). The siRNAs sequences are: siIL1 β sense: 5' UGA CCC AUG UGA GCU GAA AGC 3'; siIL1 β antisense: 5' UUU CAG CUC ACA UGG GUC AGA 3'; siGFP sense: 5' CAG GCU ACU UGG AGU GUA UUU 3'; siGFP antisense: 5' AUA CAC UCC AAG UAG CCU GUU 3'

Delivery of siRNA::peptide complexes. siRNA::peptide complexes (at molar ratio of 1:10 siRNA to peptide) were delivered through intravenous injections in the caudal vein; complexes were prepared

in 500 μ L of PBS, 5% glucose. To identify the best experimental conditions (mass of siRNA and number of injections), amounts of 25-50 μ g of siRNA/animal were evaluated, one or two injections/animal (with an 8 h interval) per animal. Brains were harvested at 48 h after the first injection. In order to characterize IL1 β silencing time course, rats were given two injections of 25 μ g of siRNAs (at 8 h intervals) and the brains were collected at the following time points: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h after first injection of siRNA. To assess silencing effect in different anatomic areas, the brain was divided into six regions as follows: hippocampus, frontal cortex, olfactory bulb, cerebellum, brain stem and hypothalamus.

Intracerebroventricular cannulation. Wistar rats were stereotaxically instrumented using a Stoelting stereotaxic apparatus, according to a method previously described (14). Cannula efficiency was tested one week after cannulation by the evaluation of the drinking response elicited by icv angiotensin II (15). Stereotaxic coordinates were: antero-posterior, 0.2 mm/lateral, 1.5 mm/depth, 4.0 mm. Icv-cannulated rats were treated for seven days, once a day, with IL1 β (2.0 μ l, 10^{-12} - 10^{-6} M). Body mass, body temperature and food intake were evaluated daily throughout the experiment.

Indirect calorimetry and spontaneous physical activity. O₂ consumption, CO₂ release, respiratory exchange ratio (RER) and spontaneous physical activity (SPA) were measured in fed animals through an indirect open circuit calorimeter (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), as described previously (16). SPA was determined in two horizontal axes, providing information on linear motility.

Immunoblotting. For evaluation of protein expression, the hypothalami of anesthetized rats were excised and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 40 min at 11,000 rpm in a 70.Ti rotor (Beckman) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye method. Aliquots of the resulting

supernatants containing 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with antibodies. Specific bands were detected by chemiluminescence and capture was performed with a Syngene GBox (Imgen Technologies, Alexandria, VA, USA).

Real-time PCR. The expressions of NPY, MCH, TRH and POMC mRNAs were measured in hypothalami obtained from HF rats treated with control or IL1 β siRNA. Intron-skipping primers were obtained from Applied Biosystems. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primers were used as a control. Real-time PCR analysis of gene expression was performed with an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through six-point, two-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 20 ng of reverse-transcribed RNA and was run according to the manufacturer's recommendations using the TaqMan PCR Master Mix. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

Citrate synthase activity. Fragments (1-3 mg) of the soleus muscle and BAT were used for the determination of citrate synthase activity by spectrophotometry, as described previously (17).

Statistical analysis. Mean values \pm SEM obtained from densitometry scans, real-time PCR, body mass determination, food intake, SPA, and respirometry parameters were compared using Tukey-Kramer test (ANOVA) or Student's *t* test, as appropriate; *p* <0.05 was accepted as statistically significant.

Results

IL1 β expression is increased in the hypothalamus of diet-induced obese rats. The expression of the mRNAs of the inflammatory cytokines, TNF α , IL2 and IL1 β , and of the anti-inflammatory cytokines, IL6 and IL10, are increased in the hypothalamus of rats fed on HF diet (Fig. 1A). Also, the mRNA level of the IL1 β endogenous inhibitor, IL1ra, is increased in the hypothalamus of rats fed on HF diet (Fig.

1A). However, at the protein level, only IL1 β (Fig.1B), but not IL1ra (Fig. 1C), is increased in the hypothalamus of rats fed on HF diet.

Small-interference RNA inhibition reduces IL1 β , but not IL1ra expression in the hypothalamus of rats.

To reduce the hypothalamic levels of IL1 β we designed a siRNA, specific for IL1 β , which was delivered to the central nervous system (CNS) as a complex with the RVG-9R peptide. After optimization, an approximately 50% reduction of IL1 β expression was obtained in the hypothalamus of HF rats (Fig. 1D and 1F). No change in the hypothalamic expression of IL1ra was induced by this method (Fig. 1E and 1F).

Inhibition of IL1 β in the CNS leads to increased body mass gain in HF rats. Eleven days inhibition of IL1 β in the CNS of HF rats resulted in a significant increase of body mass (Fig. 2A and 2B), without affecting daily (Fig. 2C) and cumulative (Fig. 2D) food intake.

Inhibition of IL1 β in the CNS leads to reduced TRH expression in the hypothalamus of HF rats. Two orexigenic and anti-thermogenic neurotransmitters, NPY and MCH, and two anorexigenic and pro-thermogenic neurotransmitters, POMC and TRH, were measured in the hypothalamus of HF rats. Upon IL1 β inhibition, only TRH expression was significantly reduced by approximately 30% (Fig. 3A).

Reduced mitochondria activity in the brown adipose tissue of CNS IL1 β -inhibited HF rats. To evaluate the effect of CNS IL1 β inhibition on tissues involved in thermogenesis we measured the amount or activity of proteins involved in mitochondria function in the brown adipose tissue and skeletal muscle. As depicted in Figures 3B-3E, the expression of PGC1 α was increased (Fig. 3B) and the activity of citrate synthase, which reflects mitochondria activity, was reduced (Fig. 3C) only in the BAT.

Inhibition of IL1 β in the CNS has no effect on HF-rats spontaneous activity and respirometric parameters. The inhibition of IL1 β in the CNS of HF rats produced no significant effect on

spontaneous activity (Fig. 4A), O₂ consumption (Fig. 4B), CO₂ production (Fig. 4C) and respiratory exchange ratio (Fig. 4D).

High-, but not low-dose icv IL1 β injection modulates body mass and food intake in lean rats. To evaluate the effects of IL1 β in the hypothalamus of lean rats, a dose response experiment was performed, injecting 2 μ l 10⁻¹² – 10⁻⁶ M IL1 β icv for seven days. As depicted in Figures 5A-5C, only the higher, but not the lower doses of the cytokine produced a significant reduction of body mass (Fig. 5A) accompanied by reduction of food intake (Fig. 5C) in the lean rats. No change in body temperature was detected (Fig. 5B).

Discussion

Inflammatory and anti-inflammatory cytokines are known to act as important mediators or modulators of a low-grade inflammation in the hypothalamus of obese rodents (10, 12, 18, 19). Increased hypothalamic expression of IL1 β has been detected in this context (4) but its role in the dysfunctional hypothalamic activity in obesity is unknown. Here, we used siRNA complexed with the RVG-9R peptide from the rabies virus (20) to deliver an IL1 β inhibitory RNA to the CNS, and thereafter, evaluate the role of central IL1 β in diet-induced obesity.

Initially, we showed that IL1 β expression, which was increased by 2-fold in the hypothalamus of HF rats, underwent a 50% reduction after the siRNA treatment, thus, returning to near lean-rat level. The delivery of the IL1 β siRNA to the CNS as a complex with the RVG-9R peptide, provides a whole-CNS inhibition of this cytokine (20). However, the basal expression of IL1 β in brain regions other than the hypothalamus is very low and unaffected by diet-induced obesity (4). Thus, we believe, the effect of the siRNA to inhibit IL1 β predominates in the hypothalamus. Moreover, this approach exerted no effect on the expression of the endogenous IL1 β inhibitor IL1ra, therefore, providing an efficient mean for studying the role of hypothalamic IL1 β in diet-induced obesity.

As the main hypothalamic effect of another inflammatory cytokine, TNF α , in the hypothalamus of obese rodents is to reduce thermogenesis and favor body mass gain (3, 11), we initially suspected

that IL1 β would act in a similar direction. However, upon CNS IL1 β inhibition, rats increased body mass gain by 50% with no significant changes in food intake. These results suggested that hypothalamic IL1 β produced endogenously in the context of diet-induced obesity, would protect against, rather than boost, body mass gain, and that this effect would not be dependent on food intake.

In concert with the above-mentioned suspicion, the inhibition of CNS IL1 β reduced the expression of hypothalamic TRH which is an important pro-thermogenic neurotransmitter (21). This outcome was accompanied by reduced activity of the enzyme citrate synthase in the BAT, which reflects mitochondria number and activity (22). Also, PGC1 α , which is an important mitochondriogenesis transcriptional co-activator (23), was increased in the BAT, possibly as a compensatory reflection of the reduced mitochondria activity.

Although, the reduced expression of IL1 β in the CNS produced a significant drop in BAT thermogenesis, this was not sufficient to reduce whole body energy expenditure, as determined by the respirometry analysis. Also, no changes in spontaneous activity were found in the CNS IL1 β inhibited rats. Thus, we suspect that the overall change in thermogenesis induced by the approach employed in this study is somewhat small, and out of the range of delectability of the respirometry assay.

In the last part of the study we performed a dose response experiment as an attempt to estimate the range of IL1 β concentration in the hypothalamus that would be necessary to produce a change in body mass without affecting body temperature and food intake, just as observed when IL1 β is inhibited in HF rats. At high concentrations of IL1 β , i.e., 10^{-6} and 10^{-8} M, there was a reduction of body mass accompanied by a reduction of food intake, which is in pace with changes detected in conditions such as sepsis and cancer in which, inflammatory cytokines are present at high levels (2, 24). At very low concentration, i.e., 10^{-12} M, no modifications of food intake, body temperature or body mass were detected. Only at the concentration of 10^{-10} M, IL1 β was capable of reducing body

mass, without affecting body temperature and food intake. Therefore, we suspect that the hypothalamic IL1 β provided by the injection of 2.0 μ l of 10^{-10} M IL1 β would match the concentration of this cytokine in the hypothalamus of diet-induced obese rats.

In conclusion, this study provides evidence for a pro-thermogenic role of IL1 β in the hypothalamus of diet-induced obese rats. This effect is in contraposition of the anti-thermogenic action of TNF α and may act as a balance, similarly to IL10 and IL6 (12), in the complex inflammatory environment in the hypothalamus of obese rodents.

Acknowledgements. This study was funded by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The Laboratory of Cell Signaling belongs to the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Obesidade e Metabolismo. We thank Dr. N. Conran for English grammar edition and Mr. M. Cruz and G. Ferraz for technical assistance.

Figures

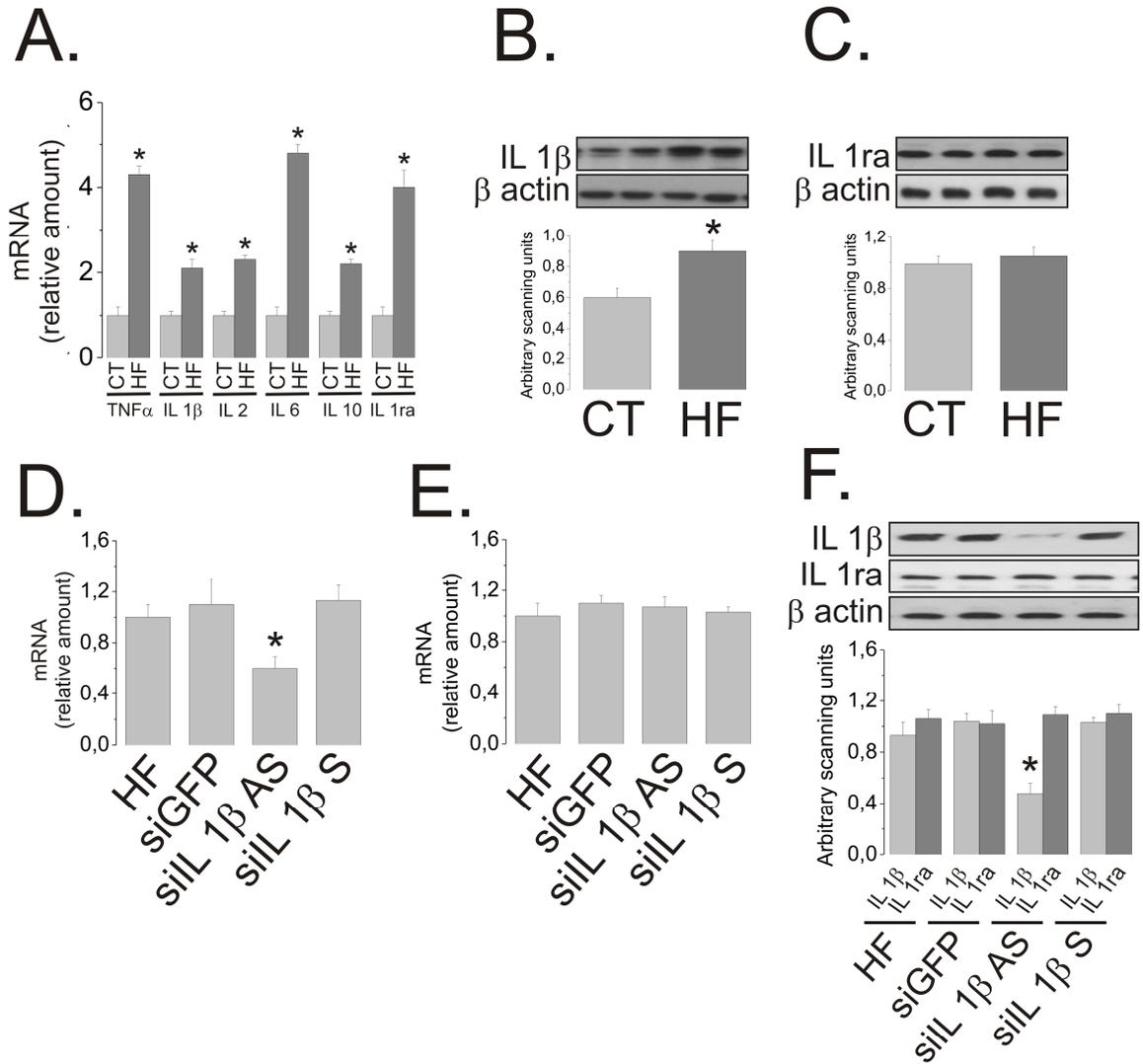


Figure 1

Figure 1. *Expression and inhibition of IL1 β* . The expressions of TNF α , IL1 β , IL2, IL6, IL10 and IL1ra mRNAs were determined by real-time PCR in the hypothalami of lean (CT) and diet-induced obese (HF) rats (A). The protein expressions of IL1 β (B) and IL1ra (C) were determined by immunoblotting

in total protein samples from the hypothalami of CT and HF rats. The expressions of IL1 β (D) and IL1ra (E) mRNAs were determined by real-time PCR in the hypothalami of HF rats treated with a control siRNA (siGFP), an IL1 β antisense (siIL1bAS) or IL1 β sense (siIL1bS) small-interference RNA. The expressions of IL1 β and IL1ra (F) protein were determined by immunoblotting in total protein samples from the hypothalami of HF rats treated with a control siRNA (siGFP), an IL1 β antisense (siIL1bAS) or IL1 β sense (siIL1bS) small-interference RNA. In all experiments n = 6; *p<0.05 vs. respective CT (in A and B), and vs. HF (in D and F). In B, C and F, the nitrocellulose membranes were reblotted with an anti- β -actin antibody.

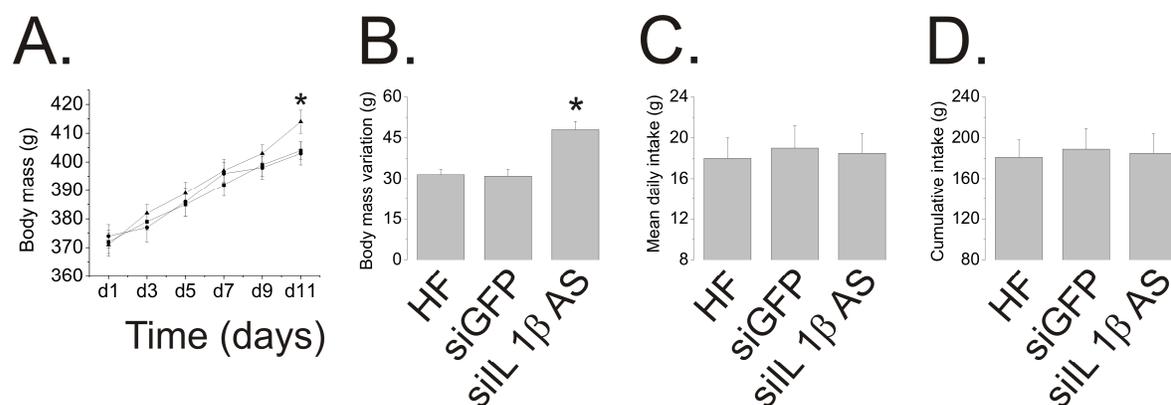


Figure 2

Figure 2. Effect of central nervous system IL1 β reduction on body mass and food intake. Body mass (A), body mass variation (B), mean daily food intake (C) and cumulative food intake (D) were determined in diet-induced (HF, circle in A) obese rats treated with a control (siGFP, square in A) or IL1 β antisense (siIL1bAS, triangle in A) small-interference RNA. In all experiments n = 6; *p<0.05 vs. HF.

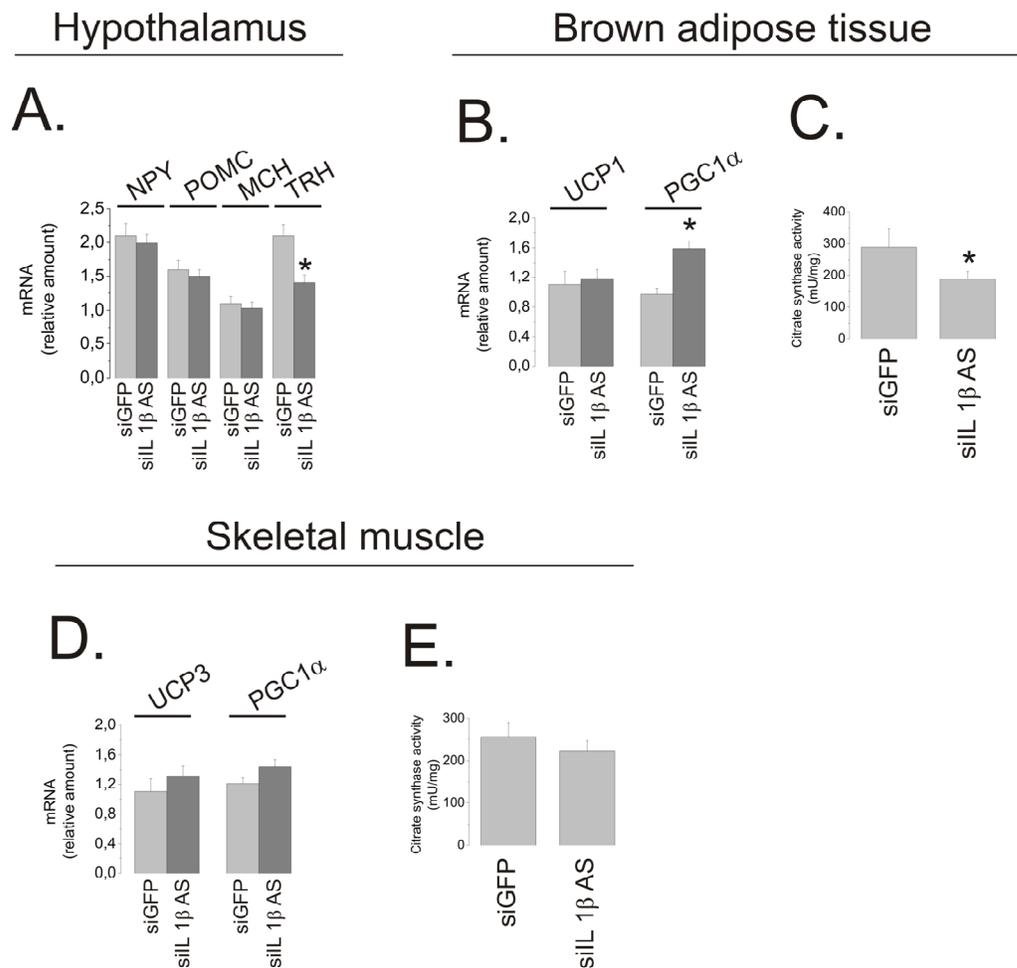


Figure 3

Figure 3. *Effect of central nervous system IL1β reduction on hypothalamic neurotransmitter expression and peripheral thermogenesis.* The expressions of the mRNAs for NPY, POMC, MCH and TRH were determined by real-time PCR in the hypothalami of obese rats treated with a control (siGFP) or IL1β antisense (siIL1bAS) small-interference RNA (A). The expressions of the mRNAs for UCP1 (B), UCP3 (D) and PGC1α (B and D) were determined by real-time PCR in the brown adipose tissue (B) or skeletal muscle (D) of obese rats treated with a control (siGFP) or IL1β antisense (siIL1bAS) small-interference RNA. Citrate synthase activity was determined in the brown adipose tissue (C) and

skeletal muscle (E) of obese rats treated with a control (siGFP) or IL1 β antisense (siIL1bAS) small-interference RNA. In all experiments n = 6; *p<0.05 vs. respective siGFP.

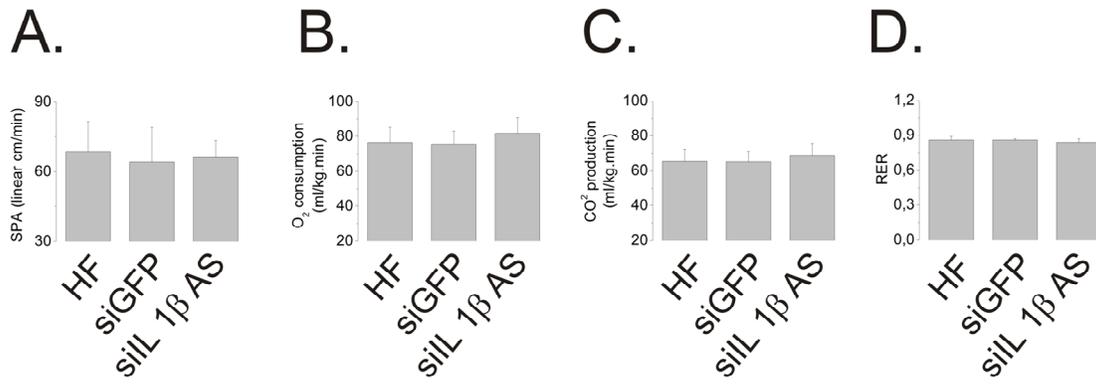


Figure 4

Figure 4. *Physical activity and respirometry in central nervous system IL1 β inhibited rats.* Spontaneous physical activity (SPA) (A), O₂ consumption (B), CO₂ production (C) and respiratory exchange ratio (RER) (D) were determined in obese rats treated with a control (siGFP) or IL1 β antisense (siIL1bAS) small-interference RNA. In all experiments n = 6.

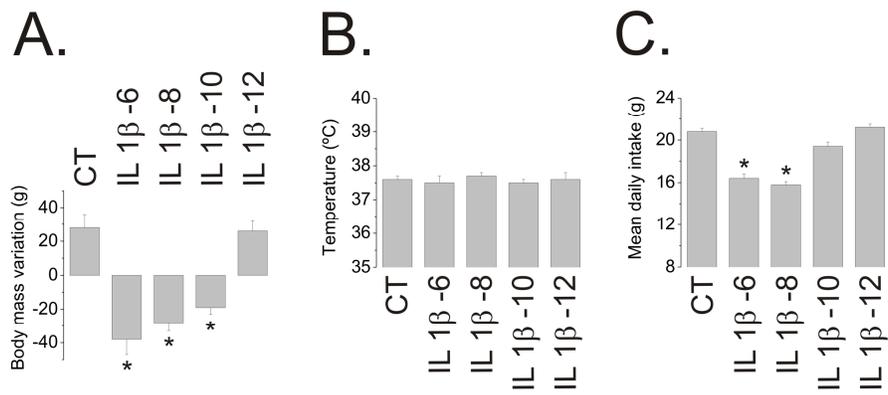


Figure 5

Figure 5. *Dose-response effect of IL1 β in the hypothalamus of lean rats.* Intracerebroventricular cannulated lean rats were treated for seven days with 2.0 μ l diluent (CT) or 10^{-12} – 10^{-6} M IL1 β and body mass variation (A), body temperature (B) and mean daily food intake (C) were determined. In all experiments n = 6; *p<0.05 vs. CT.

References

1. **Araujo EP, Torsoni MA, Velloso LA** 2010 Hypothalamic inflammation and obesity. *Vitam Horm* 82:129-143
2. **Thaler JP, Schwartz MW** 2010 Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 151:4109-4115
3. **Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS** 2004 Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 10:734-738
4. **De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA** 2005 Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192-4199
5. **Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D** 2008 Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135:61-73
6. **Picardi PK, Calegari VC, Prada Pde O, Moraes JC, Araujo E, Marcondes MC, Ueno M, Carnevali JB, Velloso LA, Saad MJ** 2008 Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 149:3870-3880
7. **Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB** 2008 Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 283:14230-14241
8. **Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre AL, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Yu F, Niswender K, Irani BG, Holland WL, Clegg DJ** 2009 Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* 119:2577-2589
9. **Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carnevali JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA** 2009 Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29:359-370
10. **Arruda AP, Milanski M, Coope A, Torsoni AS, Ropelle E, Carvalho DP, Carnevali JB, Velloso LA** 2011 Low-Grade Hypothalamic Inflammation Leads to Defective Thermogenesis, Insulin Resistance, and Impaired Insulin Secretion. *Endocrinology*
11. **Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperi GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA** 2009 Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 284:36213-36222
12. **Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, Moraes JC, Prada PO, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJ, Carnevali JB** 2010 IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 8
13. **Pereira TC, Bittencourt VDÁP, Secolin R, Rocha CdS, Maia IdG, Lopes-Cendes I** 2007 Strand Analysis, a free online program for the computational identification of

- the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy. *Genetics and Molecular Biology* 30:1206-1208
14. **Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA** 2007 TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 28:1050-1058
 15. **Johnson AK, Epstein AN** 1975 The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 86:399-418
 16. **Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carnevali JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA** 2009 Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29:359-370
 17. **Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperi GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA** 2009 Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 284:36213-36222
 18. **Denis RG, Arruda AP, Romanatto T, Milanski M, Coope A, Solon C, Razolli DS, Velloso LA** 2010 TNF-alpha transiently induces endoplasmic reticulum stress and an incomplete unfolded protein response in the hypothalamus. *Neuroscience* 170:1035-1044
 19. **Araujo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carnevali JB, Saad MJ, Velloso LA** 2007 Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 148:5991-5997
 20. **Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N** 2007 Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448:39-43
 21. **Nillni EA** 2010 Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol* 31:134-156
 22. **Hancock CR, Han DH, Higashida K, Kim SH, Holloszy JO** 2011 Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *Faseb J* 25:785-791
 23. **Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM** 1999 Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98:115-124
 24. **Arruda AP, Milanski M, Romanatto T, Solon C, Coope A, Alberici LC, Festuccia WT, Hirabara SM, Ropelle E, Curi R, Carnevali JB, Vercesi AE, Velloso LA** 2010 Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology* 151:683-694

5. CONCLUSÃO

Este estudo forneceu evidências para um papel pró-termogênico da IL1 β no hipotálamo de ratos com obesidade induzida por dieta. O efeito desta citocina se contrapõe à ação anti-termogênica do TNF α , podendo atuar como um mecanismo de equilíbrio, de forma semelhante à atividade de IL10 e IL6, no complexo ambiente inflamatório do hipotálamo de ratos obesos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akaneya Y., Takahashi M., Hatanaka H.: Interleukin-1 beta enhances survival and interleukin-6 protects against MPP+ neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons. *Exp Neurol.* 136(1):44-52, 1995.
2. Akira S., Takeda K.: Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol.* 327(6):581-9, 2004.
3. Almind K., Manieri M., Sivitz W. I.: Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2366–2371, 2007.
4. Arend, W. P., Palmer, G., Gabay, C.: IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* 223: 20–38, 2008.
5. Argyropoulos G., Harper M. E.: Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol.* 92:2187-98, 2002.
6. Arkan M. C., Hevener A. L., Greten F. R.: IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191–198, 2005.
7. Barbosa A. S., Lin C. J.: Silenciamento de genes com RNA Interferência: Um novo Instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metab* 48(5): 612-619, 2004.
8. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366, 2001.
9. Besedovsky H. O., Delrey A.: Immune-neuro-endocrine interactions—facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 64–102, 1996.
10. Besedovsky H., Del Rey A., Sorkin E., Dinarello C. A.: Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233,652–654, 1986.
11. Betz A. L., Yang G. Y., Davidson B. L.: Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15(4):547-51, 1995.
12. Block B. A.: Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol.* 56:535-77, 1994.
13. Boss O., Bachman E., Vidal-Puig A., Zhang C. Y., Peroni O., Lowell B. B. Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261:870-6, 1999.

14. Brenneman D. E., Schultzberg M., Bartfai T., Gozes I.: Cytokine regulation of neuronal survival. *J Neurochem.* 58(2):454-60, 1992.
15. Butterfield D. A., Poon H. F.: The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 40(10):774-83, 2005.
16. Cadenas S., Buckingham J. A., Samec S., Seydoux J., Din N., Dulloo A. G., Brand M. D. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS* 462: 257-260, 1999.
17. Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., Shoelson S.E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-B and NF-kB. *Nature Medicine*, 11: 183-190, 2003.
18. Cannon B., Nedergaard J.: Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84:277-359, 2004.
19. Carvalheira J. B., Siloto R. M., Ignacchitti I., Brenelli S. L., Carvalho C. R., Leite A., Velloso L. A., Gontijo J. A., Saad M. J.: Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500:119-124, 2001.
20. Carvalheira J. B., Torsoni M. A., Ueno M., Amaral M. E., Araújo E.P., Velloso L. A., Gontijo J. A., Saad M.J.: Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res.* 1:48-57, 2005.
21. Carvey P. M., Ling Z. D., Sortwell C. E., Pitzer M. R., McGuire S. O., Storch A., Collier T. J.: A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 171(1):98-108, 2001.
22. Celi F. S.: Brown adipose tissue: when it pays to be inefficient. *N Engl J Med* 360:1553-1556, 2009.
23. Choi C. S., Fillmore J. J., Kim J. K., Liu Z. X., Kim S., Collier E. F., Kulkarni A., Distefano A., Hwang Y. J., Kahn M., Chen Y., Yu C., Moore I. K., Reznick R. M., Higashimori T., Shulman G. I.: Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 117:1995-2003, 2007.
24. Crowley V. E., Yeo G. S., O'Rahilly S.: Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nature Reviews Drug Discovery* (1): 276-286, 2002.
25. Cypess A. M., Kahn C. R.: Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Endocrinology, Diabetes & Obesity* 17:143-149, 2010.

26. Dalmay T., Horsefield R., Braunstein T. H., Baulcombe D. C.: SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO Journal* 20: 2069-2078, 2001.
27. Dantzer R., O'Connor J. C., Freund G. G., Johnson R. W., Kelley K. W.: From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 46–56, 2008.
28. Dantzer R., Kelley K. W.: Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.* 21, 153–160, 2007.
29. de L A Fernandes M. L., Saad M. J., Velloso L. A.: Insulin induces tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of rats. *Brain Res.* 826(1):74-82, 1999.
30. De Souza C. T., Araujo E. P., Bordin S., Ashimine R., Zollner R. L., Boschero A. C., Saad M. J. and Velloso L. A.: Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146: 4192-4199, 2005.
31. De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., Velloso, L.A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146:4192-9, 2005.
32. Dilger R. N., Johnson R. W.: Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol.* 84(4):932-9, 2008.
33. Dinarello, C. A.: Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 519–550, 2009.
34. Dinarello, C. A.: The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 8: 1314–1325, 1994.
35. Dunn A. J.: Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res.* 6(1-2):52-68, 2006.
36. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-8, 2001.
37. Engström G., Hedblad B., Tydén P., Lindgärde F.: Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with increased incidence of heart failure: a population-based cohort study. *Atherosclerosis* 202(2):617-22, 2009.
38. Farag Y. M. K., Gaballa M. R.: Diabesity: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant* 26: 28–35, 2011.

39. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-11, 1998.
40. Flegal K. M., Carroll M. D., Ogden C. L., Curtin L. R.: Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *American Medical Association* 303: 235-241, 2010.
41. Flier J.S.: Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116(2):337-50, 2004.
42. Folli F., Bonfanti L., Renard E., Kahn C. R., Merighi A.: Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci.* (11): 6412-22, 1994.
43. Friedman J.M., Halaas J.L.: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704):763-70, 1998.
44. Galea I., Bechmann I., Perry V. H.: What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 28 (1): 12-8, 2007.
45. García E., Calvo R., Rodríguez-Sasiain J. M., Jiménez R., Trocóniz I. F., Suárez E.: Resistance to atracurium in rats with experimental inflammation: role of protein binding. *Acta Anaesthesiol Scand.* 39(8):1019-23, 1995.
46. Gesta S., Tseng Y. H., Kahn C. R.: Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242–256, 2007.
47. Gigante D. P., De Moura E. C., Sardinha L. M. V.: Prevalence of overweight and obesity and associated factors, Brazil, 2006. *Revista Saúde Pública* 43: 1-7, 2009.
48. Giulian D., Vaca K., Johnson B.: Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. *J Neurosci Res.* 21(2-4):487-500, 1988.
49. Glazov E., Phillips K., Budziszewski G. J., Schöb H., Meins Jr. F., Levin J. Z.: A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 35(3): 342-349, 2003.
50. Godbout J. P., Chen J., Abraham J., Richwine A. F., Berg B. M., Kelley K. W., Johnson R. W.: Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J.* 19(10):1329-31, 2005.
51. Gong D. W., Monemdjou S., Gavrilova O., Leon L. R., Marcus-Samuels B., Chou C. J., Everett C., Kozak L. P., Li C., Deng C., Harper M. E., Reitman M. L.: Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem* 275:16251–16257, 2000.

52. Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J.: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296, 2000.
53. Hannon G. J.: RNA interference. *Nature*. 418:244-51, 2002.
54. Hotamisligil G. S., Shargill N. S., Spiegelman B. M.: Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87-91, 1993.
55. Hotamisligil G. S.: Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444:860-867, 2006.
56. Hutvagner G., Zamore P. D.: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060, 2002.
57. IBGE: Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, 2010.
58. Johansson S., Strömberg I.: Guidance of dopaminergic neuritic growth by immature astrocytes in organotypic cultures of rat fetal ventral mesencephalon. *J Comp Neurol*. 443(3):237-49, 2002.
59. Kabiersch A., del Rey A., Honegger C. G., Besedovsky H. O.: Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. *Brain Behav Immun*. (3):267-74, 1988.
60. Ketting R. F., Haverkamp T. H., van Luenen H. G., Plasterk R.H.: Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99(2):133-41, 1999.
61. Kim S. S., Ye C., Kumar P., Chiu I., Subramanya S., Wu H., Shankar P., Manjunath N.: Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment. *Mol Ther*. 18(5):993-1001, 2010.
62. Kinoshita M. O., Furuya S., Ito S., Shinoda Y., Yamazaki Y., Greimel P., Ito Y., Hashikawa T., Machida T., Nagatsuka Y., Hirabayashi Y.: Lipid rafts enriched in phosphatidyl glucoside direct astroglial differentiation by regulating tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptors. *Biochem J*. 419(3):565-75, 2009.
63. Kopecky J., Clarke G., Enerback S.: Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest* 96:2914-2923, 1995.
64. Kumar P., Wu H., McBride J. L., Jung K. E., Kim M. H., Davidson B. L., Lee S. K., Shankar P., Manjunath N.: Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448:39-43, 2007.

65. Ling Z. D., Tong C. W., Carvey P. M.: Partial purification of a pramipexole-induced trophic activity directed at dopamine neurons in ventral mesencephalic cultures. *Brain Res.* 791(1-2):137-45, 1998.
66. Lonnemann G., Endres S., Van der Meer J. W., Cannon J. G., Koch K. M., Dinarello C. A.: Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur J Immunol.* (9):1531-6, 1989.
67. Luheshi G. N., Bluthé R. M., Rushforth D., Mulcahy N., Konsman J. P., Goldbach M., Dantzer R.: Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats. *Auton Neurosci.* 85(1-3):127-32, 2000.
68. Mano A., Gato A., Alonso M. I., Carnicero E., Martín C., Moro J. A.: Role of interleukin-1beta in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development. *Cytokine* 37(2):128-37, 2007.
69. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA: Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29:359-370, 2009.
70. Mills E. M., Banks M. L., Sprague J. E., Finkel T.: Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. *Nature*, 426:403–404, 2003.
71. O'Neill, L. A.: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226: 10–18, 2008.
72. Oprica M., Zhu S., Goiny M., Pham T. M., Mohammed A. H., Winblad B., Bartfai T., Schultzberg M.: Transgenic overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the CNS influences behaviour, serum corticosterone and brain monoamines. *Brain Behav Immun.* 19(3):223-34, 2005.
73. Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., Seya T.: TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 4(2):161-7, 2003.
74. Parish C. L., Finkelstein D. I., Tripanichkul W., Satoskar A. R., Drago J., Horne M. K.: The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice. *J Neurosci.* 22(18):8034-41, 2002.
75. Pereira da Silva M., Torsoni M. A., Nourani H. V., Augusto V. D., Souza C. T., Gasparetti A. L., Carvalheira J. B., Ventrucchi G., Marcondes M. C., Cruz Neto A. P., Saad M. J., Boschero A. C., Carneiro E. M., Velloso L. A.: Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology.* 144(11):4831-40, 2003.

76. Pereira T.C., et al.: Strand Analysis, a free online program for the computational identification of the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy Genetics and Molecular Biology. 30(4): 1206-1208, 2007.
77. Puigserver P., Wu Z., Park C. W., Graves R., Wright M., Spiegelman B. M.: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell. 92:829-39, 1998.
78. Riaz S. S., Theofilopoulos S., Jauniaux E., Stern G. M., Bradford H. F.: The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. Brain Res Dev Brain Res. 153(1):39-51, 2004.
79. Rothwell N. J., Luheshi G. N.: Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci. (12):618-25, 2000.
80. Sartipy, P., Loskutoff, D. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A., 100: 7765- 7270, 2003.
81. Schultzberg M., Tingsborg S., Nobel S., Lundkvist J., Svenson S., Simoncsits A., Bartfai T.: Interleukin-1 receptor antagonist protein and mRNA in the rat adrenal gland. J. Interferon Cytokine Res. 15, 723–731, 1995.
82. Schwartz, M. W., Porte, D. Jr. Diabetes, obesity, and the brain. Science. 307:375-9, 2005.
83. Seale P., Bjork B., Yang W.: PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. Nature 454:961–967, 2008.
84. Shi H., Kokoeva M. V., Inouye K., Tzameli I., Yin H., Flier J. S.:TLR4 links innate immunity and fatty acid - induced insulin resistance. J Clin Invest 116: 3015-3025, 2006.
85. Silva J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. Physiol Rev. 86:435-64, 2006.
86. Singh R., Xiang Y., Wang Y., Baikati K., Cuervo A. M., Luu Y. K., Tang Y., Pessin J. E., Schwartz G. J., Czaja M. J.: Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice The Journal of Clinical Investigation 119 (11),2009.
87. Sparkman N. L., Johnson R. W.: Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. Neuroimmunomodulation. 15(4-6):323-30, 2008.
88. Sparks L. M., Xie H., Koza R. A., Mynatt R., Hulver M. W., Bray G. A., Smith S. R.: A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. Diabetes, 54 :1926-33, 2005.
89. Spiegelman B. M., Flier J.S.: Obesity and the regulation of energy balance. Cell. 104:531-43, 2001.

90. Spulber S., Schultzberg M.: Connection between inflammatory processes and transmitter function—Modulatory effects of interleukin-1. *Progress in Neurobiology* 90 :256–262, 2010.
91. Storch A., Paul G., Csete M., Boehm B. O., Carvey P. M., Kupsch A., Schwarz J.: Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 170(2):317-25, 2001.
92. Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L.: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99 (2) : 12-32, 1999 .
93. Takeda K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 21:335-76, 2003.
94. Tartaglia L. A.: The leptin receptor. *J Biol Chem*. 272(10):6093-6, 1997.
95. Tehranian R., Andell-Jonsson S., Beni S. M., Yatsiv I., Shohami E., Bartfai T., Lundkvist J., Iverfeldt K.: Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. *J Neurotrauma*. 19(8):939-51, 2002.
96. Tomari Y., Matranga C., Haley B., Martinez N., Zamore P. D.: A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306:1377-1380, 2004.
97. Torsoni M. A., Carvalheira J. B., Pereira Da Silva M., de Carvalho Filho M. A., Saad M. J., Velloso L. A.: Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285(1): 216-23, 2003.
98. Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J. N., Rovio A. T., Bruder C.E., Bohlooly Y. M., Gidlöf S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H. T., Larsson N. G.: Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429(6990):417-23, 2004.
99. Ueda M., Watanabe K., Sato K., Akiba Y., Toyomizu M.: Possible role for avPGC-1alpha in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. *FEBS Lett*. Jan 579:11-7, 2005.
100. Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Marino M. W., Hotamisligil G. S.: Protection from obesity induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 389: 610–614, 1997.
101. Valério A., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Pisconti A., Palomba L., Cantoni O., Clementi E., Moncada S., Carruba M. O., Nisoli E.: TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J. Clin. Invest*. 116:2791-8, 2006.

102. Vawter M. P., Basaric-Keys J., Li Y., Lester D. S., Lebovics R. S., Lesch K. P., Kulaga H., Freed W. J., Sunderland T., Wolozin B.: Human olfactory neuroepithelial cells: tyrosine phosphorylation and process extension are increased by the combination of IL-1 β , IL-6, NGF, and bFGF. *Exp Neurol*. 142(1):179-94, 1996.
103. Velloso L. A.: The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:165-176, 2006.
104. Virtanen K. A., Lidell M. E., Orava J.: Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518–1525, 2009.
105. Weisberg, S.P., Mccann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The J. Clin. Invest.*, 112: 1796- 1807, 2003.
106. Wellen K. E., Hotamisligil G. S.: Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115:1111–1119, 2005.
107. Wlodek D., Gonzales M.: Decreased energy levels can cause and sustain obesity. *J. Theor. Biol.* 225:33–44, 2003.
108. World Health Organization Consultation on Obesity 1–253, 2011.
109. Xue B., Rim J. S., Hogan J. C.: Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res* 48:41–51, 2007.
110. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S.: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420(6913):324-9, 2002.
111. Yang G. Y., Liu X. H., Kadoya C., Zhao Y. J., Mao Y., Davidson B. L., Betz A. L.: Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18(8):840-7, 1998.
112. Ye, S. M., Johnson, R. W.: Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *J. Neuroimmunol.* 93: 139–148, 1999.
113. Ye, S. M., Johnson, R. W.: An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation* 9: 183–192, 2001.
114. Zhang Y., Kerman I. A., Laque A., Nguyen P., Faouzi M., Louis G. W., Jones J. C., Rhodes C., Münzberg H.: Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial

hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J Neurosci.* 31(5):1873-84, 2011.

115. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994.