



CARLOS KIYOSHI KATASHIMA

S-NITROSAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA E LEPTINA EM HIPOTÁLAMO DE
ROEDORES OBESOS: UM NOVO MECANISMO NA GÊNESE DA
OBESIDADE.

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

CARLOS KIYOSHI KATASHIMA

**S-NITROSAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA
INSULINA E LEPTINA EM HIPOTÁLAMO DE ROEDORES OBESOS: UM NOVO
MECANISMO NA GÊNESE DA OBESIDADE.**

Orientador: Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO CARLOS KIYOSHI KATASHIMA E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA.

Assinatura do Orientador

Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

K155s Katashima, Carlos Kiyoshi, 1976-
S-nitrosação de proteínas envolvidas nas vias de
sinalização da insulina e leptina em hipotálamo de
roedores obesos : um novo mecanismo na gênese da
obesidade / Carlos Kiyoshi Katashima. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2012.

Orientador : José Barreto Campello Carvalheira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. S-nitrosação. 2. Hipotálamo. 3. Insulina. 4.
Leptina. 5. Obesidade. I. Carvalheira, Jose Barreto
Campello, 1971-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: S-nitrosation of proteins involved in signaling pathways of insulin and leptin in the hypothalamus of obese rodents : a novel mechanism in the pathogenesis of obesity.

Palavras-chave em inglês:

S-nitrosylation

Hypothalamus

Insulin

Leptin

Obesity

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

José Barreto Campello Carvalheira [Orientador]

Márcio Alberto Torsoni

Carla Roberta Oliveira Carvalho

Data da defesa: 29-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

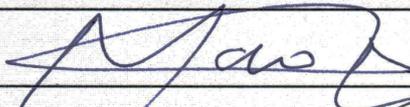
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Carlos Kiyoshi Katashima

Orientador: Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Membros:

1. Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni



2. Profa. Dra. Carla Roberta Oliveira Carvalho



3. Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira



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

Data: 29/08/2012

DEDICATÓRIA

Dedico com carinho este trabalho aos meus pais, Kuniaki e Alice à minha segunda mãe Isis, aos meus irmãos, Claudia e Fabiano, e aos pilares de minha vida Raquel e Laura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me iluminar em todos os meus passos.

A minha família por estarem sempre ao meu lado, motivando para que eu pudesse seguir no verdadeiro caminho da razão.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira o meu apreço e admiração, por acreditar em minha capacidade, pelas ricas conversas, pela orientação, e principalmente por estender os braços nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle por estar sempre ao meu lado me ensinando, e enriquecendo meu conhecimento com sua experiência e sabedoria. Obrigado por acreditar em meu potencial!

Ao Professor Mário Saad agradeço por abrir as portas de seu laboratório, por toda a estrutura oferecida para que eu pudesse realizar este trabalho, e também pelas ``piadinhas do Palmeiras``.

A Professora Patrícia Prada agradeço por acreditar em meu trabalho e pela oportunidade de aprender com sua experiência.

Aos Professores Dennys Cintra e Rodrigo Pauli agradeço pela amizade, companheirismo e pela oportunidade que me deram de ver a ciência através de um outro olhar.

Agradeço a Sandra, Dioze, pelo exemplo de profissionalismo e por sempre me socorrer em tudo que precisei. Aos técnicos Senhores Luís e Jósimo pela cooperação, brincadeiras, preparação dos reagentes e por deixar nossas caixas de blotts e tubos de extração impecáveis. ``Apesar de Sr. Jósimo ser Corinthiano``.

Agradeço aos amigos do LICRI, Alexandre Gabarra, Angélica Camacho, Bruno Carvalho, Fernanda Pace, Francine Mittestainer, Kelly Calisto, Natália Tobar, Renata A. Bagarolli, Tamires Zanotto, Tiago Araújo e Carla Bueno pela amizade e subsídios para que eu pudesse crescer.

Agradeço as amigas Paula Gabriele Quaresma, Gisele Castro, Lais Weissmann, Fernanda Fercondes e Manoela Ramalho pelas risadas e discussões científicas.

Aos amigos de grupo, Guilherme Zweig, Marília Dias, Felipe Costa, Rodrigo Marin, Maria Carolina Mendes, Daiane Sofia, Juliana Alves e Thiago Rezende agradeço pela colaboração, amizade e pelas experiências trocadas.

Aos ``Mestres`` Gustavo Pimentel, Luciene Lenhare, Thayana Micheletti, Érico Lins e Vagner Ramom (Mestrão) fica aqui documentado o meu carinho, gratidão e memoráveis madrugadas que passamos no Laboratório para que eu conseguisse concluir meus experimentos.

As técnicas do CEMIB Érica e Regina, e do núcleo de medicina experimental Senhor Zé, Antônio, Marino, Ângelo e Gustavo ``Os iluminados`` agradeço pelas risadas e solicitações que prontamente eram atendidas.

Aos alunos e atletas do Clube Jundiaiense que me fizeram aprender através do Taekwondo a encarar todos os meus adversários com determinação, garra e disciplina.

Agradeço às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT).

E todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente, por terem compreendido minhas ausências, por me mostrarem que eu era capaz de superar todas as dificuldades. Está aqui, consegui!

EPIGRAFE

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece a vitória nem a derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

O hipotálamo é uma região do sistema nervoso central que angaria informações do status nutricional e governa a liberação de múltiplos sinais metabólicos, tais como insulina e leptina para manutenção da homeostase energética. Entretanto, o aumento da prevalência de obesidade vem se revelando como um dos importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. Fatores como o hábito alimentar e o estilo de vida sedentário desempenham papel relevante na patogênese desta doença. No entanto, mecanismos moleculares envolvidos na gênese da resistência à insulina e a leptina mediados pelo aumento da atividade inflamatória como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no tecido hipotalâmico, são parcialmente conhecidos. Neste cenário, a S-nitrosação vem ganhando destaque como um importante mecanismo pós-transcricional de insulino-resistência. Assim avaliamos o papel da iNOS na indução da S-nitrosação das proteínas que compõem a cascata de sinalização da insulina (receptor de insulina, IR β / substrato 1 do receptor de insulina, IRS-1 / Akt) e leptina (fator de transcrição 3, STAT3) no hipotálamo de modelo experimental de obesidade, estabelecendo a relação entre este fenômeno com o desenvolvimento da resistência à insulina e leptina no controle da ingestão alimentar. Inicialmente, a infusão crônica de GSNO em roedores magros, induziu a S-nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3, além da redução da fosforilação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3, aumentando a ingestão alimentar e o peso corporal. A dieta hiperlipídica contribuiu para hiperfagia, obesidade e reduziu a sensibilidade à insulina e leptina no hipotálamo. Observamos ainda, aumento da expressão da iNOS e S-nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3. Paralelamente, avaliação dos efeitos do exercício físico e da inibição farmacológica e genética da iNOS, através do (L-NIL), e oligonucleotídeo antisense (ASO), reduziram a expressão da iNOS e o fenômeno da S-nitrosação no sistema nervoso central, aumentando a sensibilidade da via da insulina e leptina em neurônios hipotalâmicos, produzindo sinais de saciedade em roedores obesos. Esses achados suportam a hipótese de que a S-nitrosação hipotalâmica é um fenômeno intracelular importante e sugere a participação da iNOS como molécula chave na indução da S-nitrosação como mecanismo de resistência à insulina e leptina na gênese da obesidade.

ABSTRACT

The hypothalamus is a region of the central nervous system which raises and nutritional status information governing the release of multiple metabolic signals, such as leptin and insulin for maintenance of energy homeostasis. However, the increased prevalence of obesity is becoming one of the important clinical-epidemiological phenomena today. Factors such as eating habits and sedentary lifestyles play an important role in the pathogenesis of this disease. However, the molecular mechanisms involved in the genesis of insulin resistance and leptin mediated by increased inflammatory activity as inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the hypothalamic tissue, are partially known. In this scenario, the S-nitrosation has been gaining attention as an important post-transcriptional mechanism of insulin resistance. Thus we evaluated the role of iNOS in inducing S-nitrosation of the proteins comprising the insulin signaling cascade (insulin receptor, IR β / substrate 1 of the insulin receptor, IRS-1 / Akt) and leptin (transcription factor 3 STAT3) in an experimental model of hypothalamic obesity, establishing the relationship between this phenomenon and the development of insulin resistance and leptin on food intake control. Initially, chronic infusion of GSNO in lean rodents, induced S-nitrosation of IR β , IRS-1, Akt and STAT3, in addition to reduced phosphorylation IR β , IRS-1, Akt and STAT3, increasing food intake and body weight . The fat diet contributed to hyperphagia, obesity and reduced sensitivity to insulin and leptin in the hypothalamus. Was also observed increased expression of iNOS and S-nitrosation of IR β , IRS-1, Akt and STAT3. Parallel evaluation of the effects of physical exercise and pharmacological inhibition of iNOS gene and, through (L-NIL), and antisense oligonucleotide (ASO), reduced the expression of iNOS and the phenomenon of S-nitrosation central nervous system, increasing sensitivity towards insulin and leptin on hypothalamic neurons, producing signals of satiety in obese rodents. These findings support the hypothesis that S-nitrosation hypothalamic is an important intracellular phenomenon and suggests the involvement of iNOS as a key molecule in inducing S-nitrosation as a mechanism of resistance to insulin and leptin in obesity genesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH - <i>melanocyte-stimulating hormones</i>	Classe de hormônio peptídico
AgRP - <i>Agouti Related Peptide</i>	Neuropeptídeo orexigênico
Akt - <i>Protein Kinase B (PKB)</i>	Proteína serina - treonina-quinase
CART - <i>Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcription</i>	Neuropeptídeo anorexigênico
cNOS - <i>Constitutive NOS</i>	NOS constitutivas
CYSNO - <i>Nitroso-cysteine</i>	Nitroso-cisteína
db/db - <i>Mice with a mutation in the leptin receptor gene</i>	Camundongos com uma mutação genética no receptor da leptina
eNOS/NOS 3 - <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FOXO1- <i>Forkhead Box Protein O1</i>	Fator de transcrição FOXO1
GLUT 4 - <i>Glucose transporter type 4</i>	Transportador de glicose 4
grp-78/BiP - <i>Binding Immunoglobulin Protein (BIP)</i>	Proteína imunoglobulina de ligação (BIP)
GSNO - <i>S-nitrosogluthatione</i>	S-nitrosoglutationa
HIF- <i>Hypoxia Inducible Factors</i>	Fatores induzidos por hipóxia

IKK β - <i>Ikappa B kinase</i>	Complexo enzimático de atividade serina-quinase
IL-10 - <i>Interleukin10</i>	Citocina anti-inflamatória
IL-1 β - <i>Interleukin1β</i>	Citocina pró-inflamatória
IL-6 - <i>Interleukin 6</i>	Citocina atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória
iNOS - <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>	Óxido Nítrico Sintase Induzível
iNOS KO - <i>Inducible Nitric Oxide Synthase knockout</i>	Camundongo nocaute para iNOS
IRS1 - <i>Insulin Receptor Substrate 1</i>	Substrato 1 do receptor de insulina
IR β - <i>Insulin Receptor β</i>	Subunidade β do receptor de insulina
Jak2 - <i>Janus quinase 2</i>	Proteína implicada na sinalização da leptina
Jnk1 - <i>c-jun N-terminal kinase 1</i>	Proteína pró-inflamatória
L-NIL - <i>N6-(1 - iminoetil) - L-lisina, dihidrocloroeto</i>	Inibidor da iNOS
LPS - <i>Lipopolysaccharides</i>	Moléculas que consistem um lipídeo e um polissacárido
MAPK - <i>Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases</i>	Proteínas específicas serina - treonina-quinases

MyD88 - <i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>	Proteína que interage com TLR4
N2O3 - <i>Dinitrogen trioxide</i>	Trióxido de dinitrogênio
NFκB - <i>Nuclear Factor kappa B</i>	Fator de transcrição kappa B
nNOS/NOS 1 - <i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO - <i>Nitric oxide</i>	Óxido nítrico
NO+ - <i>Nitrosonium</i>	Nitrosônio ion (NO+)
NO2 - <i>Nitrogen dioxide</i>	Dióxido de Nitrogênio
NPY - <i>Neuropeptide Y</i>	Neuropeptídeo orexigênico
ob/ob - <i>Obese mice with a mutation in the leptin gene</i>	Camundongos obesos com uma mutação genética e não produz leptina
OB-R - <i>Leptin Receptor</i>	Receptor de leptina
PI3K - <i>Phosphatidylinositol 3-kinases (PI 3-quinase)</i>	Fosfatidilinositol-3-quinase
POMC - <i>Pró-opiomelanocortina</i>	Neuropeptídeo anorexigênico
PTP1B - <i>Protein Tyrosine Phosphatase 1B</i>	Proteína Tirosina Fosfatase 1B
RE - <i>Endoplasmic Reticulum Stress</i>	Estresse do Retículo Endoplasmático
RNA _m - <i>Ribonucleic Acid Messenger</i>	Ácido ribonucléico mensageiro

RNAr - <i>Ribonucleic Acid ribosomal</i>	Ácido ribonucléico ribossomal
S-H - <i>Thiol Grouping</i>	Grupamento tiol
SHP2 - <i>Src Homology 2</i>	Domínios proteicos homologia ao proto oncogene Src2
S-NO - <i>Grouping nitroso-thiol</i>	Grupamento nitroso-tiol
SOCS3 - <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>	Supressor de sinalização de citocinas 3
STAT 3 - <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>	Fator de Transcrição 3
TLR-4 - <i>Toll-like Receptor 4</i>	Receptor de membrana
TNF α - <i>Tumor Necrosis Factor α</i>	Fator de necrose tumoral α
UPR - <i>Unfolded Protein Response</i>	Proteína de resposta ao estresse celular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da ração padrão e dieta hiperlipídica (DHL).... 47

Tabela 2. Dosagem de insulina e TNF- α séricos em roedores administrados com veículo ou GSNO. A administração crônica de GSNO promoveu hiperinsulinemia em ratos Wistar e camundongos KO iNOS. E ratos Wistar com GSNO foram observados aumento dos níveis séricos de TNF- α . $n= 8-10$ em cada grupo. ^A $P < 0.01$ versus respectivo controle. ^B $P < 0.01$ versus KO iNOS. Valores apresentados como media \pm desvio padrão..... 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infusão crônica de GSNO no hipotálamo de roedores magros induz S-nitrosação da via da insulina e leptina. Ratos Wistar magros de 8 semanas foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante da bomba osmótica ALZET® para infusão contínua intracerebroventricular (ICV) do doador de NO S-Nitrosoglutathione (GSNO) 50 mM com o fluxo 0.25µl/hora. Avaliação da ingestão alimentar durante 7 dias **(A)**, peso corporal **(B)** gordura periepididimal **(C)**. Determinação da atividade locomotora **(D)** e do consumo de O₂ e da produção de CO₂ pelo método de analisador de gás Panlab **(E)**. Avaliação do mRNA para os neuropeptídeos anorexigênicos (POMC/CART) e os orexigênicos (NPY/AgRP) **(F)**. Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IRβ, IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(G)**. Efeito do tratamento da insulina via icv (200 mU em 2 µl) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IRβ **(H)**, fosforilação do IRS-1 **(I)** e da Akt **(J)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2µL) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(K)**. *p<0,05 versus controle (salina); # p<0,05 versus controle (insulina)..... 58

Figura 2. Obesidade induzida por dieta hiperlipídica induz a S-nitrosação da via da insulina e leptina. Avaliação da ingestão alimentar de ratos Wistar durante o terceiro e quarto mês de vida **(A)**, peso corporal **(B)** e gordura periepididimal **(C)**. Expressão da iNOS em animais magros e obesos **(D)**. Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IRβ, IRS-1 e Akt) e via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(E)**. Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2µl) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IRβ **(F)**, fosforilação do IRS-1 **(G)** e da Akt **(H)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2µL) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(I)**. Co-localização do IR POMC e NPY com a iNOS no núcleo arqueado de animais obesos **(J)**. *p<0,05 versus controle (Salina); # p<0,05 versus o respectivo controle. 61

Figura 3. Camundongos *ob/ob* apresentam ativação da S-nitrosação da via da insulina e da leptina. Avaliação da ingestão alimentar durante 7 dias em camundongos *ob/ob* (A), peso corporal (B) e gordura periepididimal (C). Expressão da iNOS em animais C57BL6 e *ob/ob* (D). Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina (E). Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2 μ l) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IR β (F), fosforilação do IRS-1 (G) e da Akt (H). Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 (I). *p<0,05 versus controle (Salina); # p<0,05 versus respectivo controle. 63

Figura 4. Exercício físico reduz a hiperfagia e a S-nitrosação da via da insulina e leptina hipotalâmica em ratos obesos. Os animais controle e obesos foram submetidos a uma única sessão de exercício físico. O protocolo de exercício consistiu em dois períodos de 3 horas, separados por 45 minutos de intervalo. Avaliação da ingestão alimentar após sessão aguda de natação (A), peso corporal (B) e gordura periepididimal (C). Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina (D). Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2 μ l) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IR β (E), fosforilação do IRS-1 (F) e da Akt (G). Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 (H). Expressão da iNOS em animais C57BL6 e *ob/ob* (I). *p<0,05 versus demais grupos; # p<0,05 versus respectivo controle. 65

Figura 5. Efeitos do tratamento com L-NIL sobre a sensibilidade à insulina em hipotálamo ratos controle e obesos. Ratos Wistar controle e obesos foram tratados com dose diária do inibidor da iNOS (1X10⁻⁶ mcg em 2 μ l), o L-NIL via icv durante 7 dias. Avaliação da ingestão alimentar 12 e 24hs após o primeiro tratamento (A), peso corporal (B) e gordura periepididimal (C). Avaliação dos efeitos do L-NIL na S-

nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(D)**. Após o último dia de tratamento com L-NIL, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente infundidos via icv insulina (200mU em 2 μ L) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IR β **(E)**, fosforilação do IRS-1 **(F)** e da Akt **(G)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(H)**. As barras representam a média \pm EPM (erro padrão da média), #p<0,05 versus demais grupos # p<0,05 versus respectivo controle. 67

Figura 6. Efeitos do tratamento com o oligonucleotídeo antisense da iNOS sobre a S-nitrosação da via da insulina e leptina em hipotálamo ratos controle e obesos.

Ratos Wistar controle e obesos foram tratados com dose diária do antisense da iNOS (100x10⁻³M em 2 μ l) via icv durante 7 dias. Avaliação da ingestão alimentar 12 e 24hs após o primeiro tratamento **(A)**, peso corporal **(B)** e gordura periepididimal **(C)**. Avaliação dos efeitos do oligonucleotídeo antisense para iNOS na S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(D)**. Após o último dia de tratamento com o oligonucleotídeo antisense para iNOS, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente infundidos via icv insulina (200mU em 2 μ L) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IR β **(E)**, fosforilação do IRS-1 **(F)** e da Akt **(G)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(H)**. As barras representam a média \pm EPM (erro padrão da média), #p<0,05 versus demais grupos # p<0,05 versus respectivo controle. 70

Figura 7. Efeitos do tratamento com GSNO sobre a S-nitrosação da via da insulina e leptina em hipotálamo de camundongos *INOS*^{-/-}.

Avaliação da ingestão alimentar de camundongos *INOS*^{-/-} magros de 8 semanas com implante da bomba osmótica ALZET[®] para infusão contínua icv do doador de NO S-Nitrosoglutationa (GSNO) 50 mM com fluxo 0.25 μ l/hora. Avaliação da ingestão alimentar durante 7 dias **(A)**, peso

corporal **(B)** e gordura periepidual **(C)**. Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(D)**. Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2 μ l) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela autofosforilação do IR β **(E)**, fosforilação do IRS-1 **(F)** e da Akt **(G)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(H)**. n= 6-8 para cada grupo. *p<0,05 versus controle (Salina); # p<0,05 versus respectivo controle. 72

Figura Suplementar 1. Quantificação de nitritos e nitratos (NOx) em homogenato hipotalâmico após a infusão de GSNO. Os nitritos e nitratos presentes no homogenato foram quantificados, como marcadores indiretos, após a redução de NO por quimiluminescência. As proteínas do hipotálamo foram quantificadas pelo método de Biureto. *p<0,05 versus o respectivo controle..... 73

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
Transmissão do Sinal de Insulina e Leptina em Hipotálamo de Ratos:	
Implicações Fisiopatológicas	24
Obesidade, Inflamação e Resistência à Insulina e Leptina	31
<i>Resistência à insulina</i>	31
<i>Resistência à leptina</i>	32
<i>Dieta hiperlipídica e inflamação hipotalâmica</i>	33
<i>Inflamação hipotalâmica contribui para obesidade induzida por dieta hiperlipídica</i>	34
<i>Efeitos anti-inflamatórios do exercício na obesidade e resistência à insulina e leptina</i>	35
<i>Mecanismos relacionando inflamação hipotalâmica e ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica</i>	36
iNOS, S-nitrosação e Resistência à Insulina e Leptina	39
JUSTIFICATIVA	43
OBJETIVOS	44
<i>Objetivo geral</i>	44
<i>Objetivos específicos</i>	44
MATERIAIS E MÉTODOS	46
RESULTADOS	57
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência da obesidade vem se revelando como um dos importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade e fatores como hábito alimentar e o estilo de vida sedentário desempenham um papel relevante na patogênese desta doença. Estima-se que existam 300 milhões de obesos no mundo. Nos Estados Unidos, aproximadamente 32% da população é classificada como obesa e 34% como sobrepeso (Baskin et al., 2005; Ogden et al., 2006). Na região sudeste do Brasil, este índice é de 6,7%. Considerando que a obesidade é a principal responsável pelo estabelecimento da síndrome metabólica e está associada a doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer, hipertensão, dislipidemias, esteatose hepática não alcoólica, entre outros (Bacha et al., 2003; Carroll et al., 2004; Carvalheira et al., 2006). O aumento excessivo do peso corporal decorrente do acúmulo de tecido adiposo constitui uma das mais importantes questões de saúde pública e o desenvolvimento de diferentes abordagens para reduzir essa doença é um ponto de grande relevância atual (Abrantes et al., 2002).

A prática regular de atividade física representa uma das pedras angulares para a prevenção e tratamento da obesidade e doenças associadas (Ropelle et al., 2006). Os efeitos decorrentes da prática de exercícios resultam em aumento do gasto energético, colaborando para a redução da adiposidade e, conseqüentemente, para a redução do peso corporal. Além destes efeitos, evidências acumuladas nos últimos anos apontam que a atividade física tem participação direta no controle da ingestão alimentar (Flores et al., 2006). Em modelos experimentais, estudos demonstraram que o exercício físico foi capaz de modular positivamente a ação de dois hormônios no sistema nervoso central que são importantes para controle da ingestão alimentar e do peso corporal, a insulina e a leptina (Cintra, 2007). Em modelo de obesidade genética (Bi et al., 2005) e de obesidade induzida por dieta rica em gordura (Ropelle et al., 2008), o exercício físico preveniu a hiperfagia e restabeleceu os sinais anorexigênicos mediados pela leptina.

O fenômeno de resistência à ação da insulina e leptina no sistema nervoso central bloqueia a ativação das vias anorexigênicas e contribui diretamente para o desenvolvimento da obesidade (Carvalheira et al., 2003), a atividade física pode ser uma estratégia terapêutica para restaurar a sensibilidade à insulina e leptina em

indivíduos obesos, e essencial para a manutenção em longo prazo do fenótipo magro. Embora seja crescente o número de evidências que suportam a participação do exercício físico na modulação do sistema nervoso central para o controle das respostas hiperfágicas decorrentes da obesidade, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

Transmissão do Sinal de Insulina e Leptina em Hipotálamo de Ratos: Implicações Fisiopatológicas

A leptina é expressa principalmente no tecido adiposo e em menores quantidades no epitélio gástrico e placenta (Maffei et al., 1995; Masuzaki et al., 1997; Bado, 1998). A proteína do gene *ob* está presente no plasma de camundongos normais, como um monômero com peso molecular de 16 kDa, não foi detectada em plasma de camundongos *ob/ob*, e foi observada em concentrações elevadas em camundongos *db/db* (Maffei et al., 1995). A administração de leptina a camundongos *ob/ob* resulta em diminuição da ingestão alimentar, perda de peso e redução dos níveis glicêmicos (Campfield et al., 1995), além de aumentar a atividade simpática em tecido adiposo marrom, com consequente aumento do gasto energético (Pelleymounter et al., 1995). Entretanto, o mesmo resultado não foi observado quando este hormônio foi injetado nos animais *db/db*.

Os níveis séricos de leptina correlacionam-se de forma positiva com o índice de massa corporal na grande maioria das populações estudadas (Maffei et al., 1995; Frederich et al., 1995; Considine et al., 1996; Havel et al., 1998). A secreção desse hormônio diminui com o jejum prolongado e estímulo β -adrenérgico (Ahima et al., 1996) aumenta em resposta à administração de insulina e glicocorticóides (De Vos et al., 1995; Saladin, 1995) A leptina é secretada de forma pulsátil e inversamente relacionada à atividade do eixo ACTH-Cortisol, ou seja, ocorre diminuição da secreção de leptina ao amanhecer e aumento no final da tarde (Licinio et al., 1997).

A leptina produzida pelo tecido adiposo informa o estado nutricional do indivíduo a centros hipotalâmicos, que regulam a ingestão alimentar e o gasto energético. Assim, a redução da quantidade de tecido adiposo leva a diminuição dos níveis circulantes de leptina, estimulando a ingestão alimentar e reduzindo o gasto

energético. Contrariamente, o aumento do estoque de tecido adiposo está associado a elevação dos níveis séricos de leptina, diminuindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético. Através desse mecanismo, o peso do indivíduo se mantém estável durante vários anos. Por que então alguns indivíduos desenvolvem obesidade e outros não? Acredita-se que a sensibilidade à leptina seja variável e que indivíduos obesos sejam resistentes à leptina (Halaas et al., 1995; Maffei et al., 1995; Considine et al., 1996; Friedman et al., 1998). Apenas uma ínfima parte da população obesa tem baixos níveis séricos de leptina e desenvolvem obesidade de forma semelhante ao camundongo *ob/ob* (Montague et al., 1997; Farooqi et al., 2001).

Vários mecanismos podem contribuir para a resistência à leptina, como a redução do transporte de leptina através de células endoteliais e da barreira hematoencefálica impedindo a chegada da leptina no fluido intersticial cerebral. Entretanto não é claro se alterações nesse processo podem levar à obesidade, mas resultados de pesquisas indicando que humanos obesos têm menor relação entre a leptina líquórica e a plasmática comparados com indivíduos controle são consistentes com essa possibilidade (Caro et al., 1996). Outra potencial causa de resistência à leptina é a redução da sensibilidade hipotalâmica a esse hormônio. Essa alteração pode ser observada em roedores ratos Zucker (Da Silva et al., 1998) e camundongos *db/db* (Lee et al., 1996) que apresentam mutações do receptor de leptina, assim como em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (El-Haschimi et al., 2000), demonstrando que fatores ambientais são capazes de modular a via de sinalização da leptina.

A identificação de receptores específicos para leptina em plexo coróide de ratos levou a uma melhor compreensão de como acontece à sinalização da leptina no sistema nervoso central e motivou o desenvolvimento de estudos visando o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na gênese da resistência à leptina. O receptor de leptina (OBR) é membro da família gp130 da classe I dos receptores de citocinas (Tartaglia et al., 1995). É encontrado em muitos tecidos com várias formas de *splicing*, sendo as mais encontradas a forma curta (OBR_S), expressa em vários tecidos, que apresenta domínios intracelulares truncados, e a forma longa (OBR_L), que apresenta domínios intracelulares longos e é expressa principalmente no hipotálamo

(núcleos paraventricular, arqueado, ventromedial e dorsomedial (Woods et al., 1996; Mercer et al., 1996)).

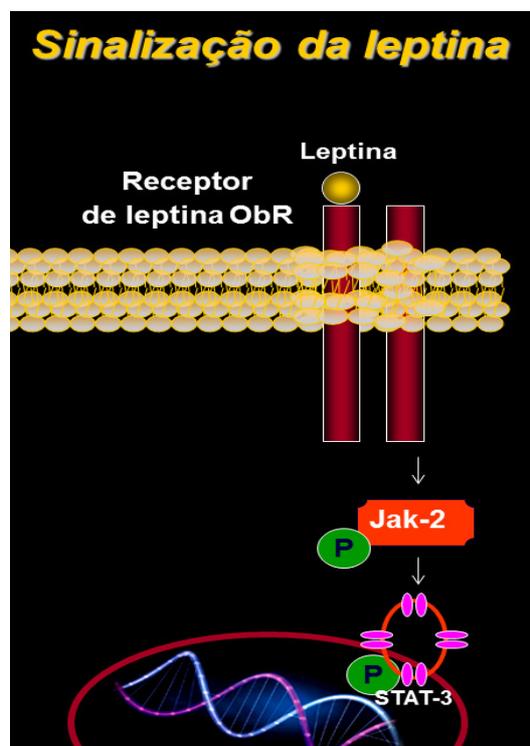
O OBR_s não tem sua função bem definida, mas parece influir no transporte da leptina através da barreira hematoencefálica e talvez contribua para a depuração da leptina atuando como uma fonte de receptor solúvel.

A homologia do receptor de leptina à classe I dos receptores de citocinas forneceu informações importantes para a descoberta dos possíveis mediadores intracelulares da ação da leptina. Os receptores da classe I das citocinas agem através das famílias das proteínas JAK (*Janus Kinase*) e STAT (*Signal Transducers Activators of Transcription*) (Heldin et al., 1995). Tipicamente, as proteínas JAK estão constitutivamente associadas com sequências de aminoácidos dos receptores, e adquirem sua atividade tirosina quinase após a ligação do hormônio a seu receptor. Uma vez ativada, a proteína JAK fosforila o receptor induzindo a formação de um sítio de ligação para as proteínas STAT, as quais são ativadas após terem se associado ao receptor e serem fosforiladas pela JAK. As proteínas STAT ativadas são translocadas para o núcleo e estimulam a transcrição.

O OBRL é capaz de estimular as proteínas STAT em resposta à sua ativação. Dois estudos (Ghilardi et al., 1996; Baumann et al., 1996) mostraram que a leptina ativa o STAT3 e STAT5 em células COS transfectadas com o OBRL, mas discordaram em relação à atividade do STAT1 e do STAT6. A proteína da família STAT mais importante para a regulação do peso corporal ainda não foi identificada. No entanto, é pouco provável que tanto o STAT1 como o STAT6 estejam envolvidos de forma significativa, uma vez que a ausência de expressão desses genes em camundongos nocaute não resultou em obesidade (Meraz et al., 1996; Durbin et al., 1996; Takeda et al., 1996; Shimoda et al., 1996). Embora o OBRL seja capaz de ativar as proteínas STAT3 e STAT5 em células COS, as proteínas do STAT que são realmente ativadas in vivo podem diferir das que são observadas nestas linhagens celulares (Tartaglia et al., 1997). Apenas a ativação do STAT3 foi detectada no hipotálamo de camundongos, após a administração exógena de leptina (Vaisse et al., 1996).

O receptor de leptina é capaz de estimular outras vias de sinalização além da JAK/STAT, tais como a via da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) e a via de

fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) (Heldin et al., 1995), e é possível que a capacidade do OBR controlar o peso dependa também destas vias de sinalização (Tartaglia et al., 1997; Niswender et al., 2001). Além disso, a leptina leva também à fosforilação do SHP2 (Carpenter et al., 1998), uma fosfotirosina fosfatase, que diminui o grau de fosforilação da JAK2 e conseqüentemente a ativação do STAT3. Uma outra proteína, SOCS3, quando ativada diminui a resposta à leptina (Bjorbaek et al., 1998).



Forma esquemática - Via de transmissão do sinal da leptina em neurônios hipotalâmicos.

Após a ativação dos receptores de leptina no cérebro e das proteínas envolvidas na transmissão do sinal desse hormônio, respostas neuronais integradas são necessárias para modular a ingestão alimentar e o gasto energético. Alguns neurotransmissores importantes para o funcionamento dessa rede neuronal estimulam

a ingestão alimentar como o neuropeptídeo Y (NPY) (Stephens et al., 1995) e o Agouti related peptide (AGRP) (Shutter et al., 1997), enquanto outros provocam redução da ingestão alimentar como o cocaine-and anphetamine-regulated transcription (CART) (Kristensen et al., 1998) e o melanocyte stimulating hormone (α -MSH) (Fan et al., 1997). A leptina regula o balanço energético diminuindo os níveis de neuropeptídeos anabólicos NPY e AGRP e aumentando a concentração de neuropeptídeos catabólicos CART e α -MSH.

Assim como a leptina, a insulina também é considerada um importante hormônio que sinaliza ao hipotálamo o estoque de tecido adiposo e modula a ingestão alimentar (Woods et al., 1979; Woods et al., 1985). A insulina circula em níveis proporcionais ao conteúdo de tecido adiposo e atravessa a barreira hematoencefálica via um sistema de transporte saturável em níveis proporcionais aos plasmáticos (Baura et al., 1993). Os receptores de insulina são expressos por neurônios envolvidos na ingestão alimentar (Baskin et al., 1988; Baskin et al., 1999; Cheung et al., 1997). A administração de insulina no sistema nervoso central reduz a ingestão alimentar e diminui o peso corporal, enquanto a deficiência desse hormônio causa hiperfagia (Sipols et al., 1995).

A correlação dos níveis séricos de insulina com o conteúdo de gordura corporal é consequência da resistência à insulina induzida pelo aumento da gordura corporal (Schwartz et al., 1997). Assim, à medida que o peso corporal aumenta a insulina deve aumentar para compensar a resistência à insulina e manter a homeostase de glicose (Polonsky et al., 1988; Kahn et al., 1993). Mesmo com altos níveis de insulina circulante é possível observar a deficiência na transmissão do sinal desse hormônio no tecido hipotalâmico de roedores. Essa alteração pode ser observada em ratos Zucker (da Silva et al., 1998) e camundongos *db/db* (Lee et al., 1996) que apresentam mutações do receptor de leptina, assim como em ratos alimentados com dieta hiperlipídica (El-Haschimi et al., 2000), demonstrando que fatores ambientais são capazes de modular a via de sinalização da insulina.

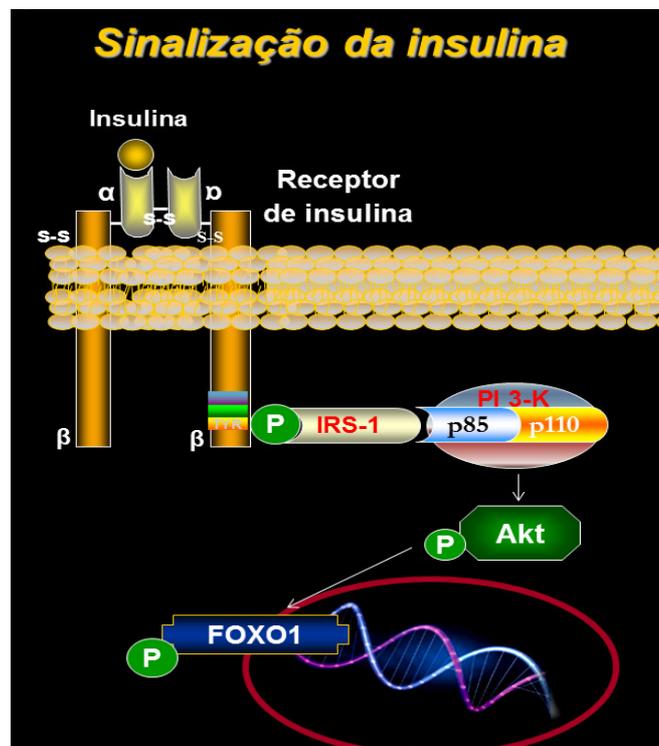
Os mecanismos moleculares de sinalização da insulina vêm sendo estudados de forma mais intensa desde o início da década de 1980, quando da caracterização da atividade tirosina quinase intrínseca do seu receptor (IR) (Kasuga et al., 1982).

Entretanto, a maioria dos estudos que geraram o conhecimento relativo à ação molecular da insulina foi desenvolvida em tecidos periféricos, tradicionais alvos da ação deste hormônio como músculo esquelético, fígado e adiposo (Saltiel et al., 2001).

Alguns estudos publicados durante as décadas de 1960 a 1980 haviam revelado a presença da insulina e de seu receptor no sistema nervoso central (Havrankova et al., 1979; Margolis et al., 1967; Woods et al., 1979), porém somente durante os últimos 10 anos obtiveram-se avanços importantes no conhecimento da ação central, ou mais especificamente, hipotalâmica da insulina. Não existem diferenças estruturais entre os receptores de insulina expressos em tecidos periféricos e no sistema nervoso central (Saltiel et al., 2001). Assim, após ligar-se ao IR expresso no hipotálamo, a insulina promove, através de modificação conformacional, a ativação de um sítio catalítico localizado na região que compreende as tirosinas 1145, 1150 e 1151 da subunidade β do receptor (White et al., 1997). Uma vez ativo, este sítio catalisa a fosforilação em tirosina dos resíduos 953, 960, 1316 e 1322, o que torna o receptor apto a dar continuidade à transdução do sinal (White et al., 1997). No hipotálamo, a insulina promove a ativação de pelo menos duas vias distintas de sinalização. A primeira depende do recrutamento e fosforilação em tirosina de substratos clássicos do IR, os IRSs, principalmente o IRS-1 e o IRS-2 (Carvalho et al., 2001; Torsoni et al., 2003). A fosforilação de IRSs promove a ligação e ativação da enzima PI3K (Carvalho et al., 2001; Torsoni et al., 2003), esse fenômeno conecta o sinal da insulina ao controle do ritmo de disparos neuronais (Xu et al., 2005). Através do controle do ritmo de disparos neuronais, a insulina modula, em paralelo à leptina, a liberação de neurotransmissores nas sinapses efectoras, induzindo sinais de saciedade (Plum et al., 2005).

Na última década estudos passaram a identificar alguns dos possíveis mecanismos que induzem a resistência à insulina nos centros controladores do apetite que podem estar envolvidos com a hiperfagia e obesidade (Carvalho et al., 2003). A hipótese de que possivelmente um processo inflamatório de baixa magnitude esteja envolvido com o descontrole dos sinais de saciedade, vem ganhando destaque (Velloso et al., 2008; Yang et al., 2008). Yang e Hotamisligil demonstraram recentemente, que animais obesos induzidos por dieta rica em gordura apresentam um aumento da

expressão/atividade de proteínas pró-inflamatórias no hipotálamo ventro-medial (VMH), e que esse processo inflamatório seria o principal evento intracelular responsável pela resistência central à insulina e à leptina em roedores, contribuindo com a hiperfagia e o desenvolvimento da obesidade. Desta forma, faz-se importante o entendimento de como as proteínas pró-inflamatórias, estão relacionadas ao fenômeno de resistência à insulina.



Forma esquemática - Via de transmissão do sinal da insulina em neurônios hipotalâmicos.

Obesidade, Inflamação e Resistência à Insulina e Leptina.

Resistência à insulina

A sobrevivência dos organismos pluricelulares está relacionada à sua capacidade de combater infecções e reparar danos, assim como à capacidade de estocar energia em épocas de fartura para épocas de maior demanda energética.

Os sistemas de reconhecimento de antígenos, assim como os sistemas de armazenamento energético são amplamente conservados desde espécies mais primitivas como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila* até os mamíferos. Recentemente acumulam-se evidências que estes sistemas são interdependentes.

Faz parte da resposta imunológica normal a mobilização de energia dos estoques para combater o agente agressor (Khovidhunkit et al., 2004). E há muito são conhecidos os efeitos da má-nutrição sobre o sistema imunológico, que causa importante e clinicamente reconhecida, imunossupressão (Chandra et al., 1996; Blackburn et al., 2001). O elo que faltava desta interdependência começou a ser desvendado ao longo das últimas duas décadas, com o reconhecimento de que a obesidade, estado de fartura energética, está relacionada a um estado pró-inflamatório subclínico relacionado à aterosclerose, hipertensão arterial e resistência à insulina (Wellen et al., 2005).

Diversos estudos epidemiológicos ligam tanto a obesidade quanto o diabetes *mellitus* tipo 2 a um estado de inflamação sub-clínico, doença na qual é possível observar a elevação do nível sérico de diversas citocinas inflamatórias (Pickup et al., 2004).

A primeira molécula a ligar o sistema imune ao metabólico foi o fator de necrose tumoral α (TNF α) (Hotamisligil et al., 1993). Esta interleucina inflamatória foi descrita inicialmente como o princípio ativo que levava a necrose tumoral em animais com infecção bacteriana (Gray et al., 1984; Pennica et al., 1984). Estudos realizados em modelos animais de obesidade, e também em humanos obesos, uniformemente mostraram aumento dos níveis de TNF α circulante (Winkler et al., 1998; Katsuki et al., 1998). Outro achado interessante é que a administração de TNF α tanto em animais, como em humanos leva a um estado de resistência à insulina (Van der Poll et al., 1991; Lang et al., 1992).

Outra importante relação de causa e efeito entre o processo inflamatório e resistência à insulina, foi observada em modelos animais que geneticamente apresentam perda de função do receptor *Toll-like Receptor-4* (TLR-4). O TLR-4 é um receptor de membrana capaz de ativar o complexo IKK e subsequentemente o fator nuclear-kB (NF-kB) responsável pelo aumento da transcrição de diversas proteínas pró-inflamatórias como (TNF- α , IL-6, IL-1 β). Neste sentido, um estudo do nosso laboratório demonstrou que camundongos com perda de função do TLR-4 mostraram-se protegidos do desenvolvimento de resistência à insulina associado à obesidade, mesmo quando submetidos cronicamente a uma dieta rica em gordura (Tsukumo et al., 2007).

Uma das principais moléculas que participam da via de transmissão do sinal da insulina e que sofre modulação negativa durante o processo inflamatório subclínico, é o substrato do IRS-1. Um dos mecanismos de resistência à insulina mediado pela inflamação é a fosforilação do IRS-1 em serina no seu resíduo 307. Esta fosforilação em serina impede que o IRS-1 seja posteriormente fosforilado em tirosina, e retrogradamente inibe a atividade tirosina-quinase do receptor de insulina. Duas serinas-quinases foram implicadas nesta ação negativa, a JNK1 e o complexo IKK. A administração de TNF α a culturas de células leva a aumento da fosforilação em serina do IRS-1, em paralelo a ativação tanto da JNK1 quanto do complexo do IKK, sendo este, possivelmente, um dos mecanismos moleculares pelo qual TNF α leva ao desenvolvimento de resistência à insulina (Wellen et al., 2005).

Resistência à leptina

Um déficit absoluto de leptina não é a causa da grande maioria dos casos de obesidade. Na verdade, a maioria dos indivíduos obesos exibem níveis circulantes de leptina elevados, compatíveis com a quantidade de tecido adiposo. Estes dados implicam a presença de resistência à leptina em indivíduos obesos. Embora os mecanismos responsáveis pela resistência à leptina permaneçam incertos, a resistência à leptina adquirida está implicada como fator que predispõe a obesidade induzida por dieta em modelos de roedores. A obesidade é fortemente relacionada à hiperleptinemia em humanos e roedores submetidos à dieta hiperlipídica e o tratamento com leptina é relativamente ineficiente na redução da ingestão alimentar e no peso corporal uma vez

que o quadro de obesidade esteja estabelecido. Essas observações suportam um modelo em que obesidade induzida por dieta surge pelo menos em parte devido à deficiência em neurocircuitos hipotalâmicos que respondem ao sinal da leptina, similar a resistência à insulina central e periférica que ocorre neste contexto (Schenk et al., 2008; Shoelson et al., 2006; Myers et al., 2008). De fato, mecanismos subjacentes à resistência à insulina induzida por dieta em nível celular podem também perturbar a sinalização da leptina (Schenk et al., 2008; Shoelson et al., 2006; Hotamisligil et al., 2006; Wisse et al., 2007; Myers et al., 2008). Entretanto, tem se demonstrado desafiador determinar se a resistência à leptina de fato causa formas comuns de obesidade ou se é meramente uma consequência do excesso de peso. Estudos recentes, que serão descritos a seguir, começaram a elucidar essa questão.

Dieta hiperlipídica e inflamação hipotalâmica

Em 2005 foi observado que alterações inflamatórias são detectadas no sistema nervoso central de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Um estudo com ratos que se alimentaram com dieta hiperlipídica durante 20 semanas constatou que havia aumento de espécies reativas do oxigênio e de produção de prostaglandina E₂ juntamente com aumento da sinalização do NF-κB no córtex cerebral desses animais (Zhang et al., 2005). Focando no hipotálamo, De Souza *et al.* (De Souza et al., 2005) demonstraram que moléculas relacionadas à imunidade, incluindo citocinas pró-inflamatórias clássicas IL-1β, TNFα, e IL-6, representaram a maior classe de genes com níveis de expressão hipotalâmica alterada após 16 semanas de dieta hiperlipídica. A via da JNK (De Souza et al., 2005) e IKKβ/NF-κB, assim como indução de estresse do retículo endoplasmático (ER) (Milanski et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Posey et al., 2009; Zhang et al., 2008) são ativadas durante esses eventos, em um quadro de tempo similar ao início da redução da sensibilidade hipotalâmica à leptina em modelos de obesidade em roedores (Fam et al., 2007; Munzberg et al., 2004). A associação da obesidade induzida por dieta com elevados níveis séricos de leptina e insulina e aumento da ativação de vias de sinalização inflamatórias levantam a possibilidade que essas duas alterações sejam causalmente relacionadas. Entretanto, animais deficientes na sinalização da leptina são obesos e hiperfágicos e manifestam ainda maior grau de

mudanças inflamatórias nos tecidos periféricos e hipotalâmicos do que animais obesos induzidos por dieta (Zhang et al., 2008). Assim, as alterações nos níveis hormonais parecem ser uma resposta à resistência e ganho de peso associado à dieta hiperlipídica que induz a inflamação e obesidade.

Inflamação hipotalâmica contribui para obesidade induzida por dieta hiperlipídica

Consistente como uma função causal da inflamação hipotalâmica na gênese da obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a ativação das vias TLR4/MyD88 ou IKK β /NF- κ B em neurônios específicos está associada com o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta, resistência à leptina hipotalâmica e resistência à insulina sistêmica (Zhang et al., 2008; Kleinridders et al., 2009). Neste sentido, a deleção do IKK β ou hiperexpressão de uma isoforma dominante-negativa do IKK β em neurônios hipotalâmicos médio-basais também reduzem ingestão alimentar e ganho de peso durante dieta hiperlipídica, confirmando que os fenótipos de nocaute congênitos não são o resultado de desenvolvimento hipotalâmico alterado (Zhang et al., 2008). Em animais geneticamente normais, a infusão central de um inibidor específico do IKK β ou anticorpos do TLR4 podem reduzir a ingestão alimentar (e peso corporal no último caso) em ratos obesos devido à dieta hiperlipídica (Milanski et al., 2009; Posey et al., 2009), mas não em animais alimentados com dieta padrão. Esses estudos identificam a inflamação hipotalâmica como um importante, mas potencialmente reversível causa do ganho de peso induzida por dieta hiperlipídica.

Complementando esses resultados, outras evidências mostram que intervenções que aumentam a inflamação no hipotálamo predispõe a obesidade induzida por dieta. Por exemplo, expressão neuronal de uma isoforma constitutivamente ativada da IKK β (Zhang et al., 2008) aumenta ingestão alimentar. Esses dados coletivamente sugerem que inflamação hipotalâmica é tanto necessária quanto suficiente para o ganho de peso inicial e persistente durante dieta hiperlipídica e assim representa um atrativo alvo para o tratamento da obesidade. Interessantemente, em um estudo de caso retrospectivo controlado recentemente publicado, o uso de tratamento anti-inflamatório (aspirina ou estatina) foi associado com uma probabilidade duas vezes maior de perda de peso em pacientes com diabetes do tipo 2 numa intervenção de 1 ano (Boaz et al., 2009).

Efeitos anti-inflamatórios do exercício na obesidade e resistência à insulina e leptina

A prática do exercício físico está associada a atenuação do processo inflamatório decorrente da obesidade com consequente melhora da resistência à insulina (Petersen et al., 2005). Trabalhos tanto em roedores e em seres humanos revelaram que a atividade física pode aumentar temporariamente os níveis de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10, em que haja mudança do peso corpóreo (Petersen et al., 2005).

A IL-10 é uma citocina importante com efeitos biológicos múltiplos. Esta citocina regula a ativação inflamatória em diferentes tipos de células, como monócitos/macrófagos e células T através da inibição da transcrição e pós-transcricional de toda a gama de citocinas pró-inflamatórias (de Waal Malefyt et al., 1991). Além disso, a IL-10 esta envolvida na redução do estresse ER intestinal células epitelial, enquanto, IL-10^{-/-} ratos demonstraram que a expressão da proteína ER grp-78/BiP resposta ao estresse foi aumentada em células intestinais epitelial em condições de inflamação crônica (Shkoda et al., 2007).

Recentemente, nosso grupo focando no hipotálamo demonstrou que o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina e leptina (Flores et al., 2006). Este fenômeno decorre de uma potente atividade anti-inflamatória no tecido hipotalâmico desencadeada agudamente pelo exercício. O exercício aumenta a concentração da citoquina anti-inflamatória, IL-10, no hipotálamo, a qual inibe a sinalização via IKK β /NF-kappaB e o estresse de retículo endoplasmático (Ropelle et al., 2010). Estes dados sugerem que o exercício pode ser considerado uma pedra angular no tratamento da obesidade como mecanismo de ação, além do aumento do gasto energético, inibidor do apetite, reduzindo a ingestão de alimentos em roedores (Handschin et al., 2008; Shepherd et al., 1995) e em humanos (Dandona et al., 2004; Hotamisligil et al., 1996).

Mecanismos relacionando inflamação hipotalâmica e ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica

A sinalização inflamatória pode influenciar a ação da leptina e da insulina no hipotálamo de diversas maneiras. Apesar de serem ligantes de receptores estruturalmente distintos, leptina e insulina sinalizam através de vias comuns, como a via IRS/PI3K e MAPK (Myers et al., 2008; Morton et al., 2006). Além disso, a leptina (mas não a insulina) altera expressão gênica através da via JAK/STAT3. Em tecidos periféricos, IKK β e JNK fosforilam os IRSs em serina, tornando-a insensível aos sinais de transdução do receptor de insulina (Hotamisligil et al., 2006; Schenk et al., 2008; Shoelson et al., 2006). De maneira semelhante, hiperexpressão hipotalâmica de uma isoforma constitutivamente ativa da IKK β diminui a sinalização da leptina e insulina (Zhang et al., 2008); reciprocamente, a administração intracerebroventricular de um inibidor da IKK ou o exercício reverte resistência à insulina hipotalâmica induzida por dieta hiperlipídica (Ropelle et al., 2010; Posey et al., 2009), além disso, a deleção da IKK β ou MyD88 neuronal restaura sensibilidade à insulina e leptina em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica (Zhang et al., 2008).

Por comparação, o papel de JNK neuronal na obesidade induzida por dieta ainda não está clara. Embora JNK hipotalâmica seja induzida pela alimentação de dieta hiperlipídica (Kleinridders et al., 2009) e nocaute JNK são resistentes para dieta hiperlipídica, nocaute específico neuronal da JNK e em camundongos foram relatados por um grupo terem retardamento do crescimento e melhora da sensibilidade à insulina, mas a susceptibilidade para dieta hiperlipídica induzida por resistência à leptina e ganho de peso (Kleinridders et al., 2009; Belgardt et al., 2010), enquanto outro grupo descobriu que este animal é resistente à obesidade induzida por dieta hiperlipídica devido ao aumento da regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Sabio et al., 2010). Novos estudos, que avaliem a função pituitária da JNK, são aguardados para a elucidação do papel da JNK neuronal para o balanço de energético.

Outro mecanismo pelo qual a inflamação hipotalâmica está ligada a resistência à insulina e leptina é através de auto-regulação do supressor de sinalização de citocinas SOCS3. Um membro de uma família de proteínas originalmente caracterizada como reguladores de feedback negativo de inflamação (Myers et al., 2008; Howard et al.,

2004). SOCS3 inibe a sinalização da insulina e a leptina tanto por ligação direta aos seus receptores e proteínas IRS para a degradação proteossômica (Myers et al., 2008; Howard et al., 2004). A ingestão de dieta hiperlipídica aumenta a expressão SOCS3 especificamente dentro do núcleo arqueado do hipotálamo coincidentemente com o aparecimento de resistência à leptina seletivamente nesta área do cérebro (Munzberg et al., 2004). O mecanismo subjacente do aumento da expressão SOCS3 durante a ingestão de dieta hiperlipídica é incerta, porque pode ser induzida através da leptina via JAK / STAT ou via IKK β / NF-kB.

Assim como a SOCS3, a proteína tirosina fosfatase PTP1B é uma molécula de interrupção de sinal que inibe a sinalização da leptina e insulina. Os mecanismos responsáveis por estes efeitos envolve sua habilidade de desfosforilar o IR, o JAK2 e outros componentes das duas vias de sinalização (Zabolotny et al., 2008). Dados recentes sugerem que dieta hiperlipídica aumenta a expressão da PTP1-B em diversos tecidos, incluindo o hipotálamo (White et al., 2009; Zabolotny et al., 2008). O fato desse efeito ser reproduzido por tratamento com TNF α sugere que existem interações funcionais entre a ativação da PTP1-B e sinalização inflamatória (Zabolotny et al., 2008). Camundongos nocaute da PTP1B em todos os neurônios (Bence et al., 2006) ou especificamente em neurônios POMC são resistentes a obesidade induzida por dieta devido melhora na sensibilidade à leptina e à insulina, mas se esta resposta está relacionada à alterações na sinalização inflamatória no hipotálamo necessita de futura investigação. Como camundongos nocaute da PTP1B em todos os neurônios e especificamente (Banno et al., 2010) em neurônios POMC e ratos *knockdown* da PTP1B apresentam redução equivalente na ingestão alimentar se alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica, esta proteína (Bence et al., 2006; Picardi et al., 2008), pode favorecer o ganho de peso via mecanismos adicionais envolvidos na inflamação hipotalâmica.

A UPR (*unfolded protein response*), um importante mecanismo associado à inflamação induzida por estresse do retículo endoplasmático, pode também contribuir para o desenvolvimento de inflamação hipotalâmica induzida por dieta hiperlipídica e resistência à leptina e insulina associadas a este quadro. Elevação do UPR em resposta ao excesso de nutrientes é a principal causa da desregulação do metabolismo

(Hotamisligil et al., 2008), em tecidos periféricos induzidos por dieta hiperlipídica e um processo similar pode também ocorrer no hipotálamo (Milanski et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008). Em tecidos periféricos, componentes do UPR desencadeiam ativação da JNK e IKK β /NF- κ B, exacerbando os efeitos inflamatórios da dieta hiperlipídica (Hotamisligil et al., 2008) e sinais inflamatórios podem potencializar a retroalimentação no desenvolvimento de estresse do RE, embora essa questão ainda não esteja elucidada. Embasando este conceito, a expressão de uma isoforma constitutivamente ativa da IKK β no hipotálamo médio basal aumenta o estresse do retículo endoplasmático (RE), enquanto que camundongos nocaute específicos em neurônios apresentam redução da UPR (Zhang et al., 2008), embora esses efeitos possam ser potencialmente confundidos pelas mudanças associadas à ingestão alimentar e peso corporal. De maneira importante, inibidores do estresse do RE, bem como o exercício restauram a sensibilidade à leptina em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e diminuem a ingestão alimentar e peso corporal em animais obesos (Ropelle et al., 2010; Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008). De maneira convergente, a indução do estresse do RE através do antibiótico tunicamicina ou por deleção da proteína XBP1 em neurônios resulta em hiperleptinemia, obesidade, hiperfagia e redução de taxa metabólica associada com severa resistência à leptina hipotalâmica (Ozcan et al., 2009). Caso a homeostase energética não seja restaurada, a UPR culmina com a indução de apoptose, recentemente descrita em hipotálamo (Moraes et al., 2009), embora a relevância funcional deste achado e sua relação com o estresse ER permaneçam desconhecidas.

Outro mecanismo de resistência à insulina descrito mais recentemente, e que também ocorre durante o processo inflamatório é o fenômeno conhecido como *S-nitrosação* (Carvalho-Filho et al., 2005). Esse fenômeno pós-transcricional, mediado pela incorporação de óxido nítrico (NO), envolve não apenas no IRS-1, mas também no IR e na proteína Akt, de maneira que a principal proteína responsável por este processo é a Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS). Entretanto, é desconhecida a função da iNOS e da nitrosação no hipotálamo.

iNOS, S-nitrosação e Resistência à Insulina.

A Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) produz NO a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina, e é importante componente do sistema imune inato, tendo sua expressão tecidual aumentada tanto após estímulo com certas interleucinas, quanto depois da infusão de LPS. Parece estar relacionada a controle de infestações intracelulares, tendo poder, tanto bactericida, quanto de bloquear a via metabólica de certos patógenos (Bogdan et al., 2001). Inicialmente descrita em macrófagos, pode ter sua expressão tecidual induzida em vários tecidos diferentes, inclusive em tecidos insulino-sensíveis (Kapur et al., 1997; Kurrek et al., 1995; Ribiere et al., 1996).

Em tecido muscular a indução da iNOS parece estar associada ao desenvolvimento de resistência à insulina. O tratamento de culturas de células musculares com LPS, TNF α e interferon γ levou a diminuição da captação de glicose induzida por insulina, em paralelo ao aumento da expressão da iNOS. Este efeito sobre a captação de glicose foi impedido com o tratamento concomitante com um bloqueador da iNOS, a saber, a aminoguanidina. Houve também redução da resistência à insulina induzida pela infusão de LPS quando os animais foram tratados com aminoguanidina (Bedard et al., 1997). Finalmente, há aumento da expressão da iNOS em músculo de modelos animais de diabetes e obesidade, como os ratos Zucker e os camundongos *db/db*. O tratamento com aminoguanidina também atenuou a resistência à insulina observada nestes animais (Piercy et al., 1998; Shimabukuro et al., 1997).

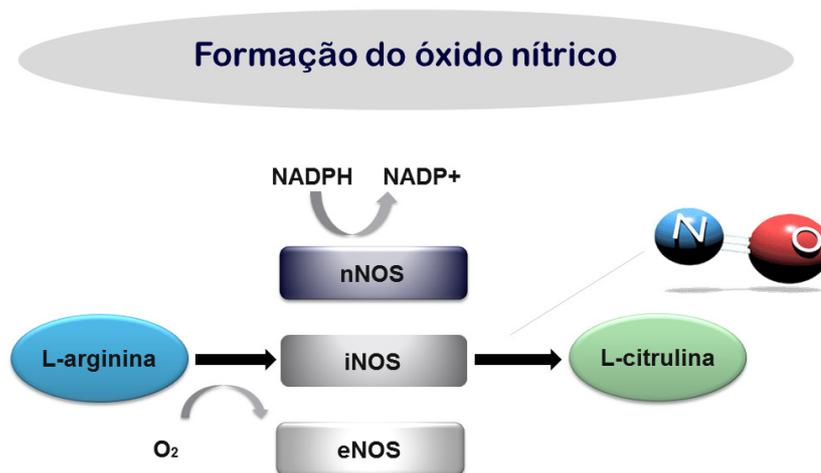
Em 1997, Marette e colaboradores descreveram que tanto o NO liberado por drogas doadoras de NO, quanto o produzido pela iNOS, leva à diminuição da captação de glicose, tanto por células musculares em cultura, quanto por tecido muscular isolado de ratos (Marette et al., 1997). Estes achados sugerem uma participação direta do NO na indução de resistência à insulina a partir do aumento da expressão da iNOS. Além disso, foi demonstrado que a resistência à insulina secundária a infusão de LPS, tanto em cultura de células musculares, quanto em tecido muscular isolado de ratos estava diretamente relacionada ao aumento da expressão da iNOS e maior produção de NO (Kapur et al., 1997).

Mais tarde, em 2001, o mesmo grupo mostrou que camundongos geneticamente modificados que não expressam a iNOS, apesar de ganharem peso quando submetidos

ao tratamento com dieta hiperlipídica, não desenvolvem resistência à insulina. Esta proteção metabólica está relacionada a uma preservação da capacidade da insulina de ativar o IR e a Akt no tecido muscular destes animais (Perreault et al., 2001).

Coletivamente, estes dados sugerem uma ligação da via de sinalização da iNOS com a via de sinalização da insulina, com uma possível regulação negativa da primeira em relação a segunda. Evidências indicam que o NO tenha papel crucial no desenvolvimento da insulino-resistência mediada pela iNOS, no entanto estas investigações se concentraram em tecidos periféricos e pouco se sabe da importância da expressão/atividade da iNOS na resistência à insulina do sistema nervoso central.

As NO-Sintases são as principais fontes intracelulares de NO e são divididas em 3 subtipos. A NO Sintase Neuronal (nNOS ou NOS 1) e a NO Sintase Endotelial (eNOS ou NOS 3) são cálcio dependentes e exercem funções biológicas importantes em seus respectivos tecidos, como regulação da apoptose neuronal, no caso da nNOS, e vasodilatação, no caso da eNOS (Davis et al., 2001; Foster et al., 2003). A NO Sintase Induzível (iNOS ou NOS 2) já foi descrita em detalhe, não é cálcio dependente e pode ter sua expressão induzida a partir do estímulo com interleucinas ou LPS.



Forma esquemática - As óxido nítrico sintases e a produção de óxido nítrico. As diferentes isoformas de óxido nítrico sintases catalisam a produção de óxido nítrico e L-citrulina a partir de L-arginina, oxigênio e de NADPH.

Uma vez produzido, o NO pode modificar a função protéica através de processos químicos diferentes, como: nitrosilação de metais de transição, nitração de tirosina e a nitrosilação ou nitrosação, que dependem principalmente da disponibilidade de espécies oxidantes e da concentração de NO liberada (Davis et al., 2001).

A nitrosação ocorre pela ligação covalente do NO com um grupamento tiol (S-H) presente em resíduos de cisteína de algumas proteínas, formando um S-nitrosotiol (S-NO) (Stamler et al., 1992). Acredita-se que uma reação direta do radical NO com o grupamento tiol não leva a formação de um nitrosotiol (Wink et al., 1994). Para tanto é necessária a oxidação do NO, após a reação com O₂, e formação de N₂O₃ (Wink et al., 1993; Hogg et al., 2002). Esta reação acontece provavelmente com mais facilidade no ambiente hidrófobo da membrana celular (Liu et al., 1998), ou em microambientes hidrófobos dentro da própria estrutura protéica (Nedospasov et al., 2000), onde NO e O₂ podem existir em maiores concentrações. O N₂O₃ pode parcialmente dissociar-se em [⁺ON·NO₂], o que favorece a reação do radical nitrosonium (NO⁺) com o enxofre nucleofílico do grupamento tiol. Portanto a S-nitrosação pode ser entendida como uma transferência do radical nitrosonium e não do radical NO. Isto explica a possibilidade de acontecer tranS-nitrosação, que é a S-nitrosação de um tiol diretamente por um nitrosotiol (Arnelle et al., 1995; Hogg et al., 1999; Liu et al., 1998). Este segundo mecanismo de S-nitrosação tem importância biológica devido à alta concentração celular de tióis de massa molecular pequena, como a glutatona, por exemplo, que poderiam funcionar como transportadores do nitrosonium para outros ambientes celulares distantes daqueles onde a formação do NO a partir da NO-sintase acontece (Martinez-Ruiz et al., 2004). Existem ainda outros modelos bioquímicos identificados in vitro para explicar a formação de nitrosotióis, como os obtidos a partir da doação de NO por nitrito (Stamler et al., 1992), ou catalizada até mesmo por metaloproteínas (Hess et al., 2005). Várias proteínas podem ter sua função modificada por S-nitrosação, como por exemplo, p21^{ras} (Williams et al., 2003), NFκB (Marshall et al., 2001), a família HIF (fatores induzidos por hipóxia) (Brune et al., 2003), metaloproteinases matriciais (Gu et al., 2002), e outros.

A S-nitrosação vem sendo valorizada como uma das principais formas de modificação protéica induzida pelo NO, devido a sua alta reatividade, por ocorrer em

condições fisiológicas, e devido a grande quantidade de processos celulares regulados por S-nitrosação descritos ao longo dos últimos anos (Hess et al., 2005).

Algumas comparações foram feitas entre S-nitrosação e fosforilação (Mannick et al., 2002; Stamler et al., 2001). Apesar de serem dois mecanismos de modificação protéica pós-translacionais, relacionados a alterações covalentes de resíduos aminoácidos, algumas diferenças devem ser ressaltadas. A especificidade da fosforilação acontece, pois a mesma é controlada enzimaticamente. Já a S-nitrosação, é uma reação química direta, mas também altamente específica, mas cuja especificidade não é determinada enzimaticamente (Martinez-Ruiz et al., 2004).

Um trabalho do nosso laboratório demonstrou que o aumento da expressão de iNOS encontrado em tecidos periféricos de roedores obesos é responsável pela S-nitrosação do receptor de insulina (IR), do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), fenômeno responsável por reduzir a fosforilação em tirosina dessas proteínas e também a fosforilação em serina da Akt (Carvalho-Filho et al., 2005). Este aumento da expressão da iNOS em modelos experimentais de obesidade sugere que esta é outra importante via da resposta imune inata que está ativada na obesidade, podendo ter participação fisiopatológica no desenvolvimento de resistência à insulina.

No sistema nervoso central e mais especificamente no tecido hipotalâmico, pouco se sabe a respeito do papel da iNOS no desenvolvimento da obesidade. Moraes e colaboradores, determinaram que a expressão da iNOS mostrou-se aumentada após a infusão intracerebroventricular com baixas doses de TNF- α e esse aumento possui relação direta com a resistência à insulina hipotalâmica e conseqüentemente com aumento da ingestão alimentar em camundongos (Moraes et al., 2006). No entanto, a expressão da iNOS e os níveis de nitrosação das proteínas envolvidas na transmissão do sinal da insulina e leptina no hipotálamo e a relação do fenômeno de nitrosação com o aumento da ingestão alimentar são completamente desconhecidos.

JUSTIFICATIVA

O aumento da prevalência de obesidade vem se revelando como um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. Fatores como a mudança do hábito alimentar e o estilo de vida sedentário desempenham papel relevante na patogênese desta doença. A ingestão alimentar e o gasto energético são minuciosamente regulados por neurônios específicos localizados no hipotálamo. O processo inflamatório subclínico frequentemente observado em modelos experimentais de obesidade estão diretamente associados a distintos mecanismos de resistência à insulina e leptina no hipotálamo e resultam em aumento da ingestão alimentar e ganho de peso corporal. No entanto, esses mecanismos moleculares envolvidos na gênese da resistência à insulina e à leptina mediados pela inflamação no tecido hipotalâmico, são apenas parcialmente conhecidos. A S-nitrosação vem sendo valorizada como um importante mecanismo de resistência à insulina associada à inflamação, contudo sua participação no controle da ingestão alimentar é incerta. Neste sentido, acreditamos que o presente trabalho possa contribuir para o melhor entendimento de como a S-nitrosação de proteínas em neurônios modulam a sensibilidade à insulina, leptina, a ingestão alimentar e o peso corporal, abrindo novos caminhos para o tratamento da obesidade e doenças associadas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo é caracterizar a S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3 no hipotálamo de roedores obesos e relacionar esse fenômeno com a resistência à insulina e leptina no controle da ingestão alimentar.

Objetivos específicos:

Etapa 1 – Avaliação dos efeitos do doador de óxido nítrico (GSNO) em hipotálamo em roedores magros.

- Investigar os efeitos do tratamento intracerebroventricular do doador de NO (GSNO), a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos, a ingestão alimentar e peso corporal de ratos magros.
- Determinar os efeitos do tratamento intracerebroventricular do doador de NO (GSNO) na S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3, e na sensibilidade à insulina e leptina em hipotálamo de ratos magros.
- Investigar os efeitos do tratamento intracerebroventricular do doador de NO (GSNO) na S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3, na sensibilidade à insulina e leptina, ingestão alimentar e o peso corporal em camundongos nocaute para iNOS.

Etapa 2 – Caracterização da S-nitrosação hipotalâmica em diferentes modelos experimentais de obesidade.

- Localizar a expressão da iNOS nos diferentes núcleos hipotalâmicos de animais obesos e a sua colocalização com a proteína IR e neuropeptídeos POMC e NPY.
- Avaliar a expressão e o papel da proteína iNOS na indução da S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3 em hipotálamo de diferentes modelos experimentais de obesidade.
- Caracterizar a S-nitrosação das proteínas que compõem a cascata de sinalização da insulina (IR, IRS-1 e Akt) e leptina (STAT3) e estabelecer a relação entre este

fenômeno com o desenvolvimento da resistência à insulina e leptina no controle da ingestão alimentar.

Etapa 3 – Avaliar os efeitos dos tratamentos fisiológico (Exercício Físico), farmacológico (L-NIL) e genético (ASO) na S-nitrosação hipotalâmica em modelos experimentais de obesidade.

- Avaliar o efeito do exercício físico sobre a expressão hipotalâmica da iNOS, a S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3 e sobre a ingestão alimentar em ratos controle e obesos.
- Investigar o efeito do tratamento intracerebroventricular do inibidor farmacológico da iNOS (L-NIL) e avaliar a S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3, a fosforilação das proteínas IR, IRS-1, Akt, a sensibilidade à leptina, a ingestão alimentar e o peso corporal em ratos controle e obesos.
- Investigar o efeito do tratamento intracerebroventricular do oligonucleotídeo antisense da iNOS e avaliar a S-nitrosação das proteínas IR, IRS-1, Akt e STAT3, a fosforilação das proteínas IR, IRS-1, Akt, a sensibilidade à leptina, a ingestão alimentar e o peso corporal em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Insulina recombinante humana (Humulin®) foi fabricada pela Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). A proteína A com iodo radioativo (¹²⁵I) foi fornecida pela Amersham (Aylesbury, UK). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2mm) foi da marca Schleicher & Schuell. Os anticorpos monoclonais anti-fosfotirosina, anti-PI 3-quinase (p85) foi importado da Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, NY). Anti-IR, anti-IRS-1, anti-Akt, Anti-STAT3, anti-fosfotirosina, anti-fosfo IR, anti-fosfo IRS-1, anti-fosfo Akt, anti-fosfo STAT3, anti-iNOS, anti-JNK, anti-fosfoIKK, foram importados da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA).

Animais

Ratos machos de 4 semanas de idade, da raça Wistar e camundongos, foram obtidos na Universidade de Campinas à partir do centro de reprodução animal (CEMIB). A investigação foi aprovada pelo comitê de ética e seguiu as orientações da Universidade para o uso de animais em estudos experimentais e ensaios em conformidade com a *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo the U.S. National Institutes of Health (NIH publicação Nº 85-23, 1996). Os animais foram mantidos em 12h:12h em ciclos artificiais claro-escuro e alojados em gaiolas individuais. Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle, alimentados com ração padrão para roedores (3948 kcal.Kg⁻¹), e DIO, alimentados com uma ração rica em gordura (5358 kcal.Kg⁻¹) à vontade para 3 meses (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal da ração padrão e dieta hiperlipídica (DHL).

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

Camundongos ob/ob

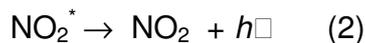
Camundongos machos B6.V-Lep^{ob} (*ob/ob*) de 4 semanas de idade e seus respectivos controles C57BL/6J (C57) foram obtidos a partir de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), e fornecidos pela Universidade de São Paulo. Para este efeito, foram utilizados os camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) que, espontaneamente, desenvolvem obesidade, quando mantidos em dieta padrão.

C57BL/6 iNOS KO

Camundongos C57BL/6 iNOS KO que não possuem óxido nítrico sintase indutível iNOS ($\bar{/}$) foram obtidos a partir do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), e mantidos em ambiente estéril, criados em gaiolas com microisolator autoclavados (Lab Products, Maywood, New Jersey) sob específicas condições livres de patógenos no Centro de Reprodução Central da Universidade de Campinas.

Quantificação de nitrito e nitrato

Os nitritos e nitratos presentes no homogenato foram quantificados, como marcadores indiretos, após a redução de NO por quimiluminescência. As proteínas do hipotálamo foram quantificadas pelo método de Biureto. Depois de quantificação de proteínas, as amostras foram centrifugadas em 12000 rpm a 4°C durante 45 minutos, a fim de remover o material insolúvel que poderiam comprometer a análise. As amostras foram então injetado na câmara de reação do óxido nítrico Sievers Analyzer NOATM (General Electric Co., Boulder, CO), que foram então completadas com uma solução de redução de cloreto de vanádio (III) em ácido clorídrico que reduziu nitrito e nitrato de NO. O NO libertado foi conduzida por um fluxo de azoto para a unidade de detecção de quimiluminescência, onde nenhum reagiu com ozônio (O₃), gerando NO₂ no estado encerrado, como mostrado nas equações seguintes:



A emissão de luz no retorno de NO₂* para o estado fundamental é proporcional à quantidade de NO₂ e é utilizado para quantificar NO. A calibração foi efetuada com uma solução de nitrato de sódio. Os dados obtidos foram corrigidos para a concentração de proteína em cada amostra.

Implante das cânulas e bomba osmótica ALZET® (DURECT Corporation)

Os animais controles e obesos foram submetidos à anestesia com Ketamina (50mg/Kg de peso corporal) e Xilasina (50mg/Kg de peso corporal). O procedimento foi iniciado quando os reflexos corneano e de retirada da pata a dor estiverem abolidos. Os ratos foram adequadamente posicionados no aparelho para realização de cirurgia estereotáxica e, após tricotomia e anti-sepsia da região craniana, foi realizado incisão inter-parietal de aproximadamente 1,5cm de extensão. A seguir, o periósteo foi divulsionado e com a calota craniana exposta foi possível individualizar o Bregma. A implantação das cânulas obedeceu às coordenadas estereotáxicas previamente estabelecidas através do atlas estereotáxico de Paxinos (PAXINOS and WATSON,

1986), para o terceiro ventrículo: AP (ântero-posterior): -0,5mm, L (lateral): 0,0mm, V (vertical): -8,5mm. Depois de implantada, foi posicionada a bomba osmótica ALZET® (DURECT Corporation) para infusão contínua intracerebroventricular (ICV) dos diversos tratamentos em seguida a cânula foi fixada ao crânio do animal com acrílico polimerizante.

Tratamentos

Administração intracerebroventricular de insulina e leptina

Os animais receberam infusão intra-hipotâmica de veículo, insulina (200mU), ou leptina (10^{-6} M) às 6:00 pm para avaliar a ingestão de alimentos ou de insulina e sinalização da leptina. A ingestão de alimentos foi determinada mensurando a diferença entre o peso da ração dada e o peso de ração no final de um período de 12 h.

S-nitrosoglutathione (GSNO)

S-nitrosoglutathione (GSNO) foi preparado pela reação de glutathione com nitrito de sódio em solução ácida (Oliveira MG *et al.*, 2002). Foi administrado via infusão intracerebroventricular (ICV) S-nitrosoglutathione (GSNO) a uma taxa de 0,25ul/h utilizando uma mini-bomba osmótica durante 7 dias. Mini-bombas (Alzet, modelo 1002) foram completadas com 50mM de GSNO e preparado por 24h, a 37°C. Para a implantação da bomba e cânula, os ratos e camundongos foram anestesiados com ketamina (10mg) e diazepam (0.07mg) (peso do corpo 0.2ml/100g), fixado a uma armação estereotáxica após a perda do reflexo de retirada da pata. A bomba osmótica foi implantada subcutaneamente sobre as escápulas e equipado com uma cânula intracerebroventricular implantado de acordo com as coordenadas terceiro ventrículo na linha média de 0,5 mm posterior ao bregma e 8,5 mm abaixo da superfície do crânio de ratos e 1,8 mm posterior ao bregma e 5,0 mm abaixo da superfície do crânio de camundongos. Após a cirurgia, todos os animais foram alojados individualmente para o restante do experimento.

L-NIL(N⁶-(1-iminoethyl)-lysine, hydrochloride)

Ratos Wistar controle e obesos foram tratados com dose diária do inibidor da iNOS L-NIL(N⁶-(1-iminoethyl)-lysine, hydrochloride) (2µl/1X10⁻⁶mcg), L-NIL via intracerebroventricular a uma taxa de 0,25 µl/h utilizando um mini bomba osmótica. Minibombas (Alzet, modelo 1002) foram preenchidos 3 mM de L-Nil (veículo salino) e preparado por 24h, a 37°C. A bomba osmótica foi implantado subcutaneamente sobre as escápulas e equipado com uma cânula intracerebroventricular implantado de acordo com as coordenadas terceiro ventrículo na linha média de 0,5 mm posterior ao bregma e 8,5 mm abaixo da superfície do crânio de ratos. O tratamento permaneceu por 7 dias. Após o último dia de tratamento com L-NIL, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente infundidos via intracerebroventricular com 2µl de insulina e leptina. Após a cirurgia, todos os ratos foram alojados individualmente para o restante do experimento.

Oligonucleotídeo antisense iNOS

Oligonucleótidos modificados para iNOS (sentido, 5'-GCATACCTGAAGGTG-3' e anti-sentido 5'-GCATACCTGAAGGTG-3') foram obtidos a partir de Invitrogen (Gaithersburg, MD). Ratos Wistar controle e obesos foram tratados com dose diária de (2µl/100x10⁻³M), via intracerebroventricular a uma taxa de 0,25µl/h utilizando uma mini-bomba osmótica. Mini-bombas (Alzet, modelo 1002) foram preenchidos 3mM de antisense (veículo-salina) e preparado por 24h, a 37°C. Oligonucleotídeo antisense iNOS foi diluído em tampão Tris / EDTA (10mmol/l de Tris-HCl, 1mmol/l de EDTA). A bomba osmótica foi implantada subcutaneamente sobre as escápulas e equipado com uma cânula intracerebroventricular implantado de acordo com as coordenadas terceiro ventrículo na linha média de 0,5 mm posterior ao bregma e 8,5 mm abaixo da superfície do crânio de ratos. O tratamento permaneceu por 7 dias. Após o último dia de tratamento com antisense da iNOS, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente infundidos via intracerebroventricular com 2µl de insulina e leptina. Após a cirurgia, todos os ratos foram alojados individualmente para o restante do experimento.

Protocolo de Exercício Físico e Mensuração de Ingestão Alimentar

A sessão de exercício físico consistiu de dois períodos de 3 horas de natação separados por 45 minutos de intervalo, conforme descrito por Ropelle e colaboradores (Ropelle et al., 2006). Os ratos exercitados e sedentários foram tratados com insulina ou veículo ($2 \mu\text{l} - 10^{-8} \text{ M}$), icv no início da noite (18:00h) e a ingestão alimentar foi medida nas 12 e 24 horas seguintes.

Consumo de oxigênio e determinação da atividade locomotora

Oxigênio produção de dióxido de consumo / carbono e taxa de troca respiratória (RER) foram medidos em animais alimentados através de um sistema controlado por computador calorímetro, em circuito aberto LE405 analisador de gases (Panlab - Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Os animais foram alojados individualmente em câmaras respiratórias claras e ar ambiente foi passado através de câmaras com um caudal de 0,6L/min. O fluxo de ar dentro de cada câmara foi monitorada por um sensor Air Supply & Switching (Panlab - Harvard Apparatus). Sensores de gás foram calibrados antes do início dos experimentos com os padrões de gás primários contendo concentrações conhecidas de O₂, CO₂ e N₂ (ar líquido, São Paulo, Brasil). As análises foram realizadas em triplicata, de 6 min para cada câmara.

Portanto, cada rato foi avaliado durante 18 min. Valores de referência exteriores de ar foram coletados a cada quatro medições. Amostra de ar passou sequencialmente por O₂ e sensores de CO₂ para a determinação de O₂ e teor de CO₂, desde que medidas de consumo de oxigênio (VO₂) e produção de dióxido de carbono (VCO₂) foram estimados. O VO₂ e VCO₂ foram calculados pelo software Metabolism 2.2v e expresso em mL.h⁻¹.g⁻¹, com base na equação Withers e o RER foi calculado usando VCO₂/VO₂. A atividade locomotora espontânea foi avaliada períodos de 30 e 90 min, utilizando um sistema de detecção, controlado por computador a partir de Panlab - Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA.

Excisão do hipotálamo

Os fragmentos hipotalâmicos foram coletados 15 minutos após o estímulo com insulina ou leptina e foram homogeneizados em 10 volumes de tampão A, com um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35). Este tampão A é composto por Triton-X 100 1%, TRIS (pH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM e aprotinina 0,1mg/ml, a 4°C.

Os extratos desses tecidos foram centrifugados a 15.000 rpm a 4°C por 45 minutos para a remoção do material insolúvel.

Análise protéica por immunoblotting

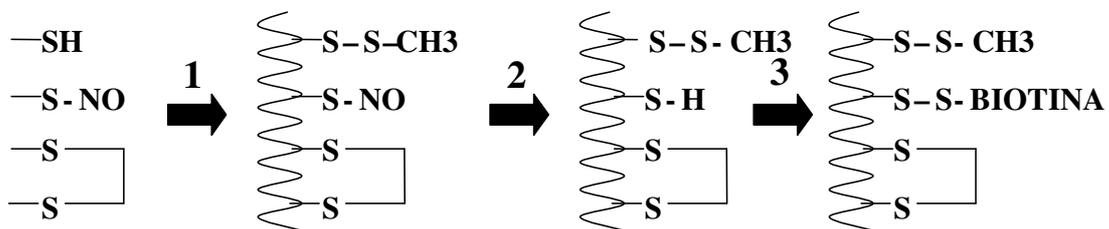
As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) contendo DTT 100mM e aquecidas em água fervente por 4 minutos. A seguir foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Como padrão, foi utilizado o marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da Bio-Rad por 2 horas a 120 volts (Towbin et al., 1979). Porém no tampão foi acrescentado SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) a 4°C overnight. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos, anti-receptor de insulina (1:1000), anti-IRS-1 (1:1000), anti-AKT (1:1000), anti-STAT3 (1:1000), anti-fosfo IR (1:1000), anti-fosfo IRS-1 (1:1000), anti-fosfo Akt (1:1000), anti-fosfo STAT3 (1:1000), diluídos em solução bloqueadora (com 0,3% de BSA ao invés de leite). Mantidos assim a 4°C overnight e lavados com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 60 minutos. Estas membranas serão então incubadas com 2 μ l de anticorpo secundário e posteriormente incubadas com solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente será

detectada e visualizada em autoradiografias usando intensificadores, e mantidos a -80°C. A intensidade das bandas será quantificada por densitometria óptica através do programa Un Scan.

Biotinilação de Nitrosotiois

Este método para detecção de nitrosotiois foi publicado por Jaffrey e colaboradores no periódico eletrônico Science STKE (Jaffrey et al., 2001), e identifica os compostos S-nitrosados numa seqüência de reações que descreveremos a seguir. Imaginemos uma determinada proteína que possua resíduos de cisteína que podem estar S-nitrosados ou não. Na primeira etapa do método as cisteínas livres, não S-nitrosadas, são bloqueadas através da metilação com MMTS (metil-metano-tiosulfonato). A seguir, as cisteínas hipoteticamente S-nitrosadas são reduzidas a sua forma livre, a partir da adição e incubação com ácido ascórbico. No próximo passo, as cisteínas recém liberadas são submetidas à incubação com HPDP-biotina, que formará compostos do tipo-S-S-BIOTINA. Então as amostras são incubadas com estreptavidina-AGAROSE, ou neutravidina-AGAROSE, que têm afinidade pela biotina, e posteriormente centrifugadas e lavadas. O pellet contendo somente proteínas originalmente S-nitrosadas na amostra inicial, foi então incubado com tampão para separação em gel de poliacrilamida. Após a separação, foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose, e imunoblotting com anticorpo contra a proteína a ser investigada. Podemos visualizar o método de forma esquemática na figura abaixo:



1 – Metilação – MMTS

2 – Redução das cisteínas S-nitrosadas

3 - Biotinilação

O método de biotinição

Extração Tecidual

- Extração e homogeneização tecidual utilizando-se o tampão 1 em temperatura de 4°C, com as amostras protegidas da luz. Concentração de aproximadamente 1 grama de tecido para 16 ml de tampão.
- Centrifugação a 2000g por 10 minutos a 4°C.
- Separação do sobrenadante.
- Dosagem da concentração protéica.
- Acrescentar CHAPS 10%, para concentração final de 0,4% na amostra.
- Separar alíquotas com a mesma quantidade de proteína, para um volume máximo de 100µl.

Bloqueio das Cisteínas livres (S-H)

- Acrescentar 300 µl da Solução Bloqueadora em cada tubo. Homogeneização e incubação a 50°C por 30 minutos, protegido da luz, em agitação contínua, ou frequente.
- Ao final da incubação, acrescentar 800µl de acetona a -20°C em cada tubo. Deixar encubando a -20°C por 10 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos a 2000g e 4°C. Ressuspender o pellet com mais 800µl de acetona a -20°C, centrifugar novamente com mesmos parâmetros e separar o pellet.

Biotinição dos nitrosotiois

- Acrescentar 60µl do tampão 2 para ressuspender o pellet.
- Acrescentar 2µl de uma solução de Ácido ascórbico 50mM. Agitar vigorosamente.
- Acrescentar 20µl de uma solução 4mM de HPDP-Biotina por tubo. Agitar a mistura e deixar reagir em temperatura ambiente por 1 hora. Não precisa mais proteger da luz.
- Após a incubação, acrescentar 200µl de acetona a -20°C e incubar por 20 minutos a -20°C para remover a HPDP-biotina.
- Centrifugar as amostras por 10 minutos, 2000g a 4°C. Ressuspender com mais 200µl de acetona a -20°C. Nova centrifugação com mesmos parâmetros e separação do pellet.

- *Separação das proteínas biotiniladas*

- Ressuspender o pellet com 60µl do tampão 2 (0,1 ml por mg de proteína na amostra inicial)
- Acrescentar 120µl do tampão 3.
- Acrescentar 25µl de estreptavidina-agarose ou neutravidina-agarose para purificar as proteínas biotiniladas.
- Incubação por 1 hora em temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 200g.
- Lavar o pellet 5 vezes com 500µl do tampão 4. Centrifugar a 200g por 5 segundos em temperatura ambiente entre cada lavada

Preparação das amostras para eletroforese

- Incubar o pellet com 30µl do tampão 5.
- Acrescentar 10µl do tampão de Laemili por amostra.
- Ferver por 5 minutos, centrifugar e separar o sobrenadante para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito previamente.

Os anticorpos usados foram anti-IR, anti-IRS-1, anti-Akt, anti-STAT3 que foram importados da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA).

TAMPÃO 1

- Hepes.NaOH pH 7,7 250 Mm
- EDTA 1 mM
- Neocuproina 0,1 mM

TAMPÃO 2

- Tampão 1
- SDS 1%

TAMPÃO 3

- Hepes.NaOH pH 7,7 20 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- Triton x-100 0,5%

TAMPÃO 4

- Tampão 3
- NaCl 600 Mm

TAMPÃO 5

- Hepes.NaOH pH 7,7 20 mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM
- 2-mercaptoetanol 100 mM

SOLUÇÃO BLOQUEADORA

- Tampão 1
- SDS 2,5%
- MMTS 20 mM

Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm S.E.M. As diferenças entre o grupo magro e obesos e entre os obesos sedentários e o grupo submetido ao protocolo de exercício foram avaliadas utilizando uma forma de análise de variância (ANOVA). Quando ANOVA indicou significância, teste com Bonferroni pós-teste. Significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tratamento com doador de NO (GSNO) intracerebroventricular induz aumento da ingestão alimentar e peso corporal.

A infusão contínua de GSNO intracerebroventricular durante 7 dias resultou em aumento da ingestão alimentar, peso corporal, gordura periepídídima (Fig. 1A-C). A administração crônica de GSNO induziu hiperinsulinemia em ratos Wistar magros e camundongos KO iNOS (Tab. 2). O GSNO infundido por 7 dias elevou os níveis séricos de TNF- α em ratos Wistar (Tab. 2). Observamos também que o GSNO é estável em tecido hipotalâmico como pode ser constatado com a mensuração do NO_x após a administração do doador de NO (Fig. 1S). Em concordância com estes dados os animais tratados com GSNO apresentaram redução da atividade no período noturno e gasto energético além de redução da expressão de neuropeptídeos anorexigênicos (POMC e CART) e aumento dos orexigênicos (NPY e AgRP) (Fig. 1D-F). Concomitantemente a estes achados observamos aumento da nitrosação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e leptina em hipotálamo de ratos tratados com GSNO (Fig. 1G). Como pode ser observada na Figura 1G, a injeção intracerebroventricular de GSNO aumentou fortemente a nitrosação do receptor de insulina (IR β), substrato do receptor da insulina (IRS-1), Akt e STAT3. A administração intracerebroventricular de insulina em animais pré-tratados com GSNO resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina do IR β , do IRS-1 e da fosforilação em serina da Akt, quando comparados ao controle (Fig. 1H-J). A injeção intracerebroventricular de leptina em animais pré-tratados com GSNO resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina da STAT3, quando comparados ao controle (Fig. 1K).

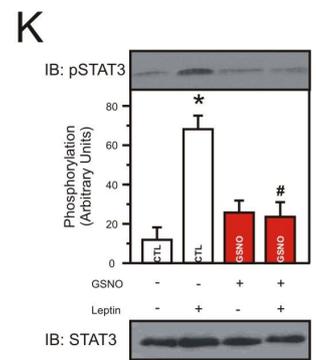
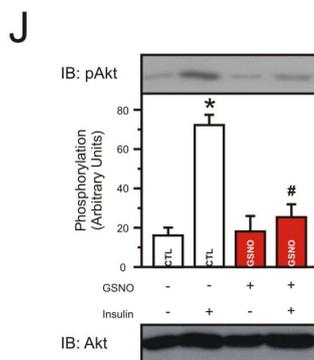
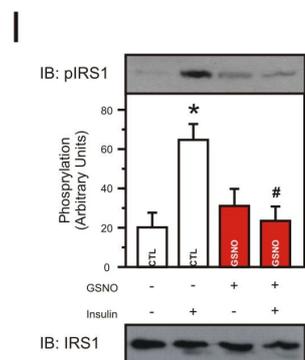
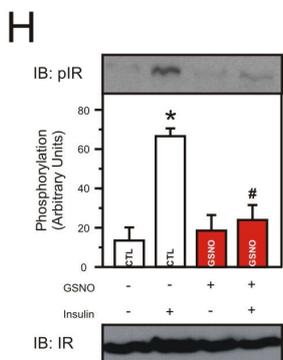
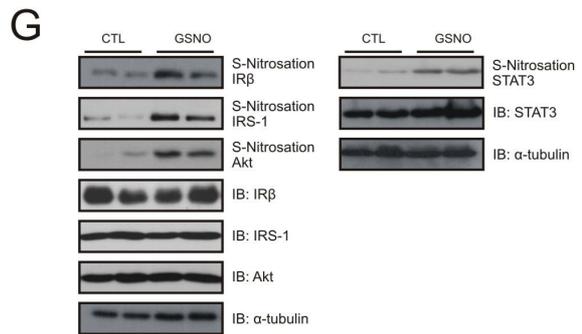
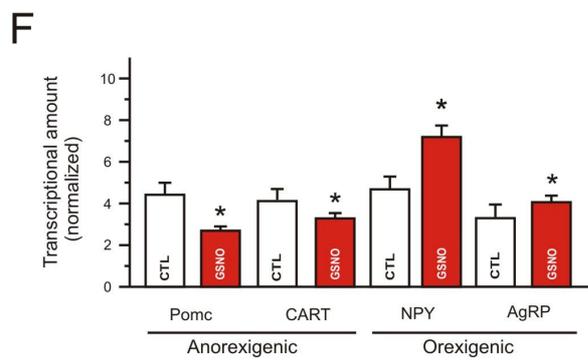
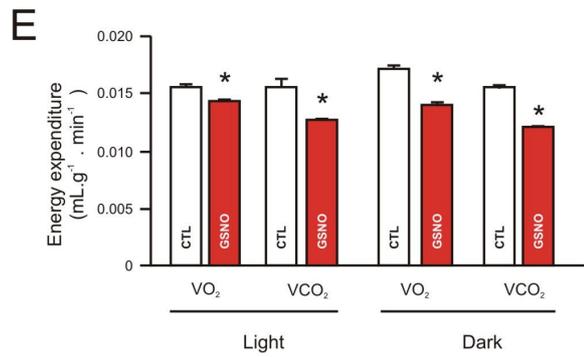
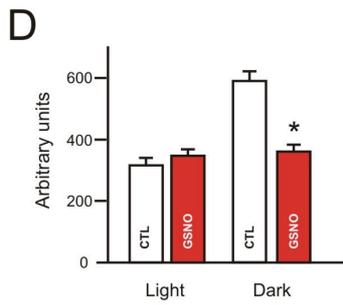
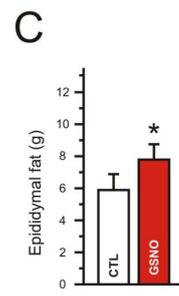
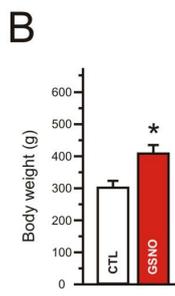
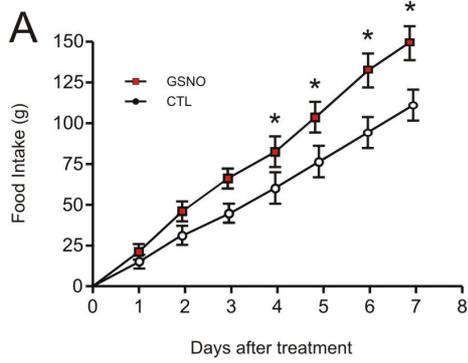


Figura 1. Infusão crônica de GSNO no hipotálamo de roedores magros induz S-nitrosação da via da insulina e leptina. Ratos Wistar magros de 8 semanas foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante da bomba osmótica ALZET® para infusão contínua intracerebroventricular (ICV) do doador de NO S-Nitrosoglutationa (GSNO) 50 mM com o fluxo 0.25µl/hora. Avaliação da ingestão alimentar durante 7 dias **(A)**, peso corporal **(B)** gordura periepididimal **(C)**. Determinação da atividade locomotora **(D)** e do consumo de O₂ e da produção de CO₂ pelo método de analisador de gás Panlab **(E)**. Avaliação do mRNA para os neuropeptídeos anorexigênicos (POMC/CART) e os orexigênicos (NPY/AgRP) **(F)**. Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IRβ, IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(G)**. Efeito do tratamento da insulina via icv (200 mU em 2 µl) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IRβ **(H)**, fosforilação do IRS-1 **(I)** e da Akt **(J)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶ M em 2µL) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(K)**. *p<0,05 versus controle (salina); # p<0,05 versus controle (insulina).

Tabela 2. Insulina e TNF-α séricos em roedores administrados com veículo ou GSNO.

	WISTAR		CAMUNDONGOS	
	CTL	GSNO	KO iNOS	KO iNOS GSNO
Insulina (ng/mL)	0.84 ± 0.09	3.4 ± 1.25 ^A	0.4 ± 0.06	3.5 ± 1.5 ^B
TNF-α (pg/mL)	25.7 ± 0.94	29.0 ± 3.36 ^A		

A administração crônica de GSNO promoveu hiperinsulinemia em ratos Wistar e camundongos KO iNOS. Ratos Wistar com GSNO foram observados aumento dos

níveis séricos de TNF- α . $n= 8-10$ em cada grupo. ^A $P < 0.01$ versus respectivo controle. ^B $P < 0.01$ versus KO iNOS. Valores apresentados como media \pm desvio padrão.

Obesidade induzida por dieta leva a S-nitrosação de proteínas envolvidas na sinalização da insulina e leptina.

Ratos Wistar alimentados por dieta rica em gorduras durante 8 semanas (DIO) apresentam aumento da ingestão alimentar, do peso corporal e da gordura periepidual (Fig. 2A-C). Concomitantemente a estes achados observamos aumento da expressão da iNOS (Fig. 2D) e nitrosação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e leptina em hipotálamo de ratos alimentados com dieta rica em gorduras (Fig. 2E). Como pode ser observado na Figura 2E a obesidade induzida por dieta aumenta fortemente a nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3 no hipotálamo destes animais. A administração intracerebroventricular de insulina a animais alimentados com dieta rica em gorduras resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina do IR β , do IRS-1 e da fosforilação em serina da Akt, quando comparados ao controle (Fig. 2F-H). A injeção intracerebroventricular de leptina em animais obesos induzidos pela dieta resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina da STAT3, quando comparados ao controle (Fig. 2I). Para esclarecer se a iNOS estava expressa em neurônios envolvidos no controle da ingestão alimentar e gasto energético avaliamos com microscopia confocal a colocalização do IR, POMC e NPY com a iNOS. Observamos que estas proteínas estavam colocalizadas principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo (Fig. 2J).

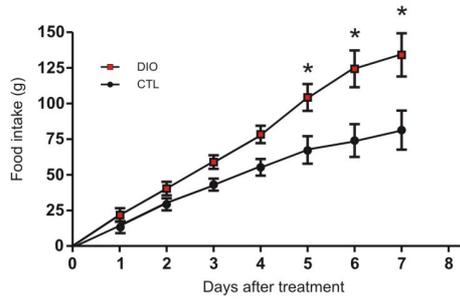
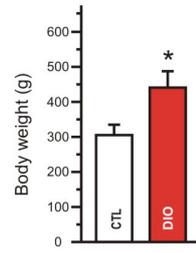
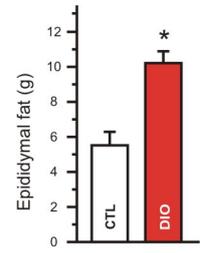
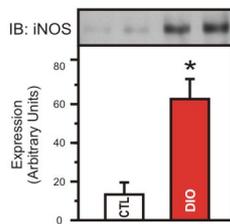
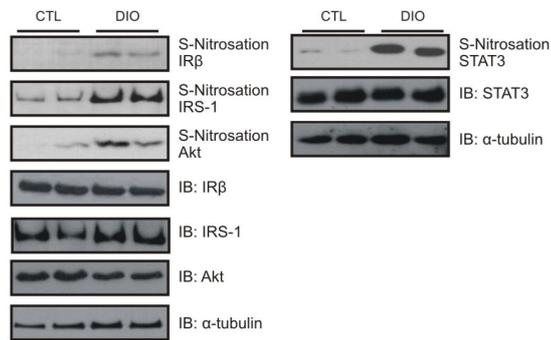
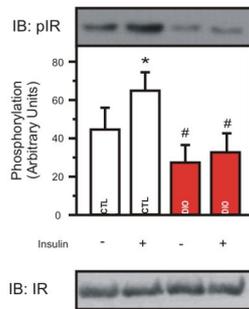
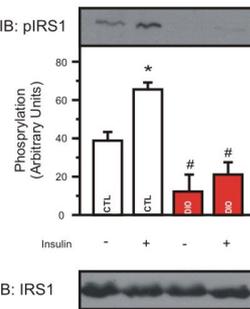
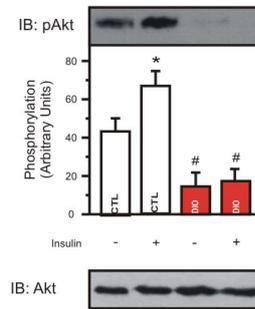
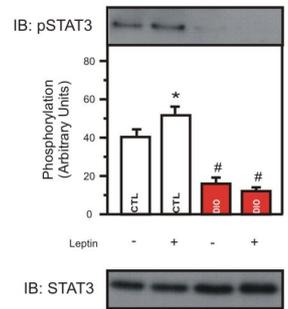
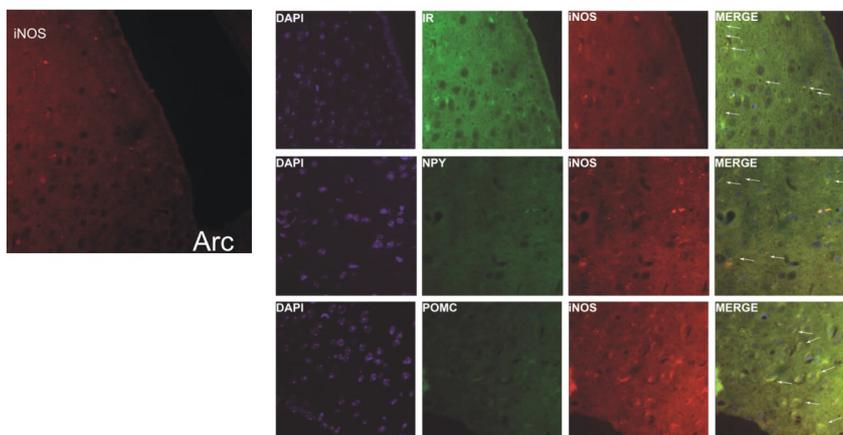
A**B****C****D****E****F****G****H****I****J**

Figura 2. Obesidade induzida por dieta hiperlipídica induz a S-nitrosação da via da insulina e leptina. Avaliação da ingestão alimentar de ratos Wistar durante o terceiro e quarto mês de vida **(A)**, peso corporal **(B)** e gordura periepídica **(C)**. Expressão da iNOS em animais magros e obesos **(D)**. Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(E)**. Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2 μ l) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela autofosforilação do IR β **(F)**, fosforilação do IRS-1 **(G)** e da Akt **(H)**. Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(I)**. Co-localização do IR POMC e NPY com a iNOS no núcleo arqueado de animais obesos **(J)**. *p<0,05 versus controle (Salina); # p<0,05 versus o respectivo controle.

Camundongos com obesidade geneticamente induzida apresentam S-nitrosação de proteínas da via de sinalização da insulina e leptina no hipotálamo.

Como amplamente relatado na literatura os camundongos *ob/ob* apresentam hiperfagia, aumento de peso corporal e da gordura corporal (Fig. 3A-C). Concomitantemente a estes achados observamos aumento da expressão da iNOS (Fig. 3D) e nitrosação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e leptina no hipotálamo de camundongos *ob/ob* (Fig. 3E). Como pode ser observado na Figura 3E a obesidade induzida por dieta aumenta fortemente a nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3. A administração intracerebroventricular de insulina a camundongos *ob/ob* resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina do IR β , IRS-1 e da fosforilação em serina da Akt, quando comparados ao controle (Fig. 3F-H). A injeção intracerebroventricular de leptina em animais obesos induzidos pela dieta resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina da STAT3, quando comparados ao controle (Fig. 3I).

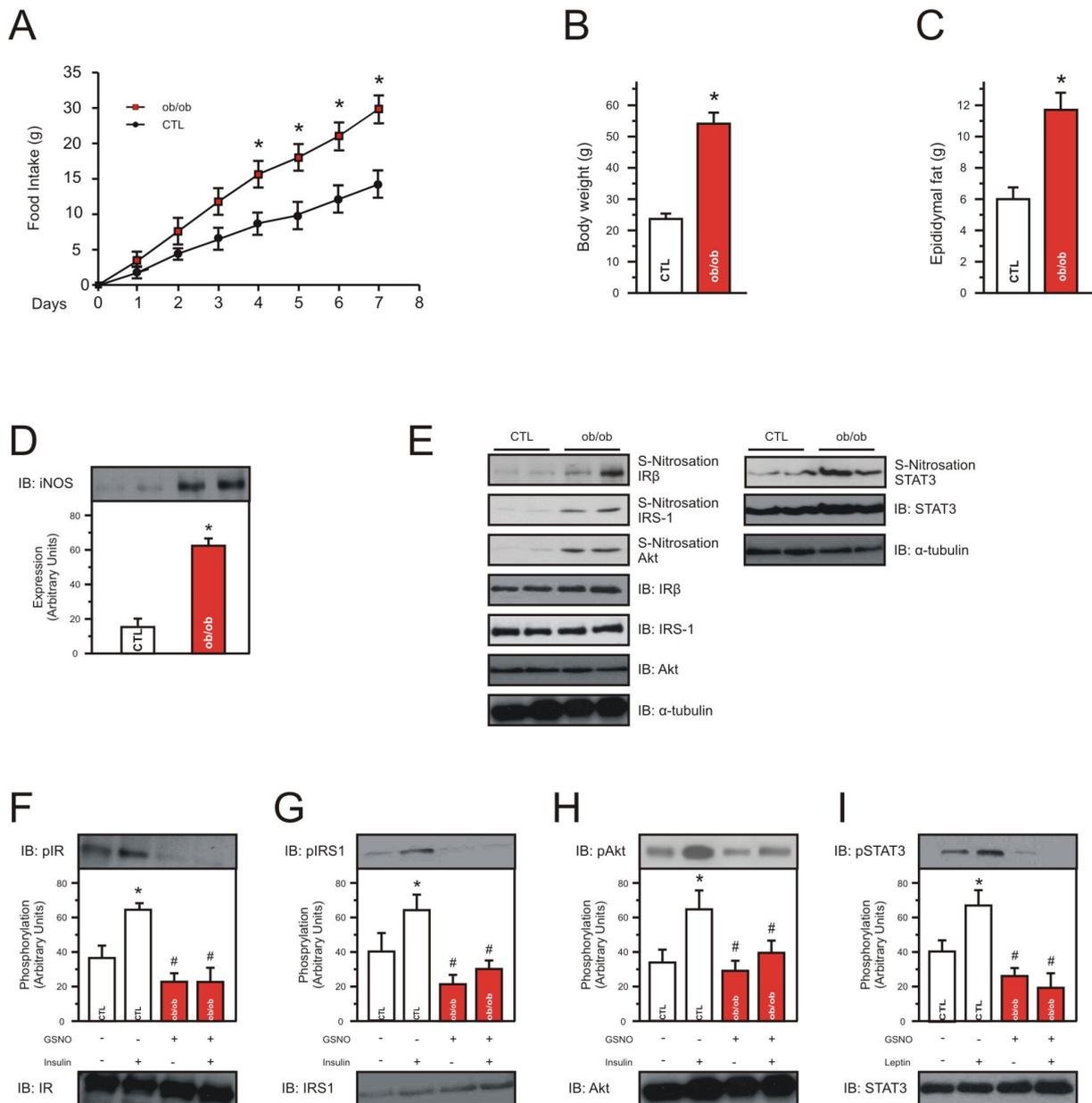


Figura 3. Camundongos *ob/ob* apresentam ativação da S-nitrosação da via da insulina e da leptina. Avaliação da ingestão alimentar durante 7 dias em camundongos *ob/ob* (A), peso corporal (B) e gordura periepididimal (C). Expressão da iNOS em animais C57BL6 e *ob/ob* (D). Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina (E). Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2 μ l) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação

do IR β (**F**), fosforilação do IRS-1 (**G**) e da Akt (**H**). Infusão com leptina icv (10^{-6} M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 (**I**). * $p < 0,05$ versus controle (Salina); # $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Exercício agudo atenua a S-nitrosação hipotalâmica aumentando sinais de saciedade.

Para investigar se a inflamação subclínica da obesidade estaria envolvida na nitrosação de proteínas do hipotálamo realizamos uma sessão aguda de exercício, estratégia capaz de reduzir a inflamação hipotalâmica de animais obesos (Ropelle et al., 2010). Como pode ser observado na figura 4A o exercício reduziu a ingestão alimentar em animais obesos ao passo que os animais magros não apresentaram alteração da ingestão alimentar. Como esperado não houve redução de peso corporal e da quantidade de gordura epididimal com uma sessão de exercício (Fig. 4B-C). Interessantemente, uma sessão isolada de exercício reduziu a expressão da iNOS (Fig. 4D) e da nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3 induzida pela dieta rica em gordura (Fig. 4E). Em paralelo, observamos que o exercício reverteu a resistência a sinalização da insulina e leptina no hipotálamo de animais submetidos à dieta rica em gorduras. Assim, podemos observar um aumento da fosforilação do IR β , IRS-1 e Akt após a administração de insulina ICV em animais exercitados que foram submetidos a uma sessão aguda de exercício (Fig. 4F-H). Também observamos aumento da fosforilação do STAT3 após a injeção de leptina em animais submetidos a uma sessão aguda de exercício (Fig. 4I).

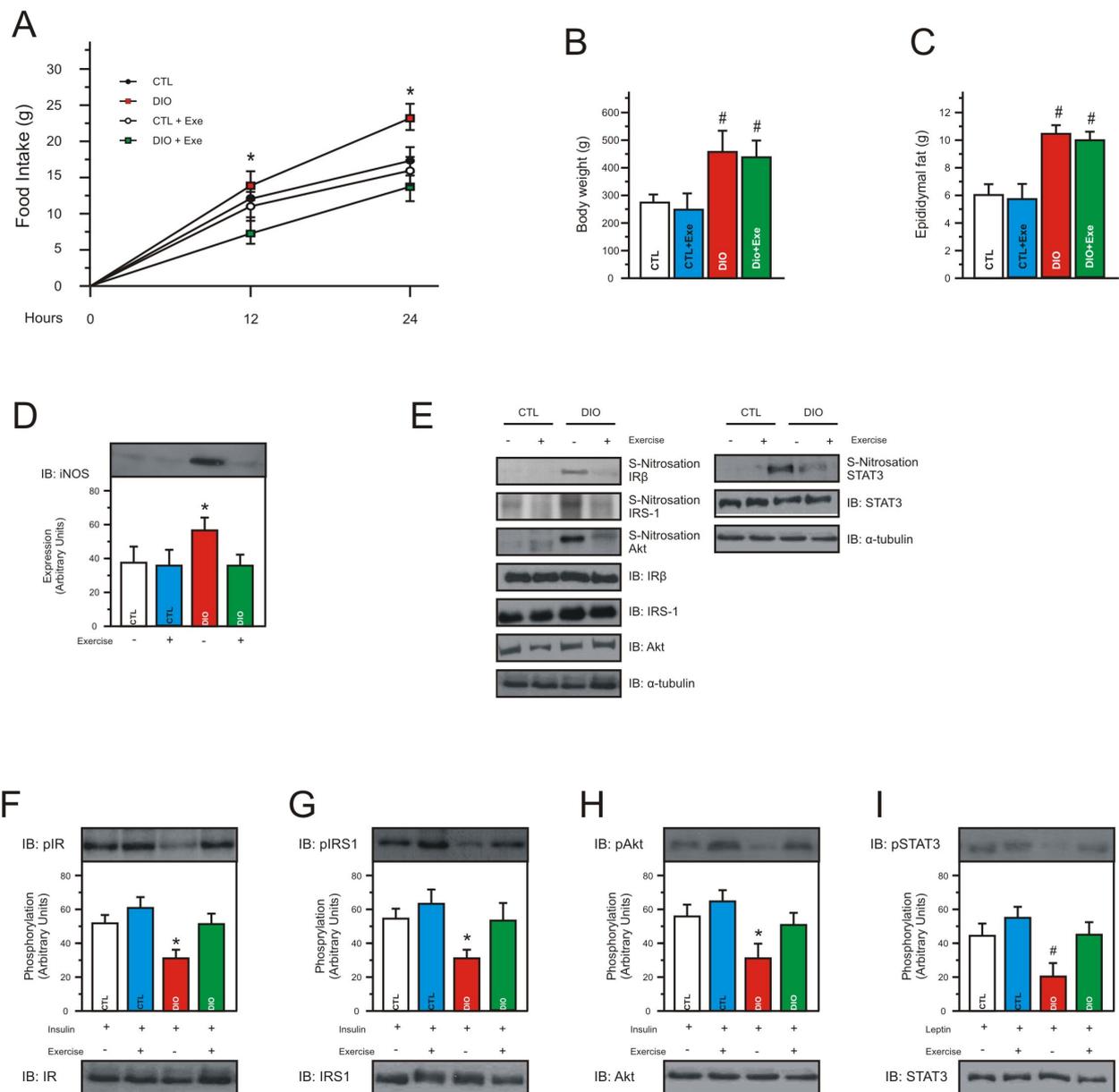


Figura 4. Exercício físico reduz a hiperfagia e a S-nitrosação da via da insulina e leptina hipotalâmica em ratos obesos. Os animais controle e obesos foram submetidos a uma única sessão de exercício físico. O protocolo de exercício consistiu em dois períodos de 3 horas, separados por 45 minutos de intervalo. Avaliação da ingestão alimentar após sessão aguda de natação (**A**), peso corporal (**B**) e gordura periepididimal (**C**). Expressão da iNOS em animais C57BL6 e *ob/ob* (**D**). Avaliação da S-nitrosação da via da insulina (IRβ, IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3)

quantificado pelo método de biotina **(E)**. Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2µl) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IRβ **(F)**, fosforilação do IRS-1 **(G)** e da Akt **(H)**. Infusão com leptina icv (10^{-6} M em 2µL) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(I)**. * $p < 0,05$ versus demais grupos; # $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Tratamento ICV com L-NIL em aumenta a sensibilidade à insulina e leptina em hipotálamo de ratos obesos.

Uma vez observado aumento da expressão da iNOS no hipotálamo de ratos obesos e sua reversão com o exercício, nós elaboramos a hipótese de que a inibição da atividade da iNOS poderia atenuar a resistência à insulina e à leptina em animais alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica. Para investigar esta hipótese, administramos o inibidor da iNOS, o L-NIL (2 µl / 1×10^{-6} mcg) em ratos Wistar controle e obesos. Como pode ser observado na Figura 5A houve redução expressiva da ingestão alimentar apenas nos animais obesos que foram tratados com L-NIL. Conforme esperado não houve modificação do peso corporal e da gordura periepididimal após a infusão aguda de L-NIL (Fig. 5B-C). A inibição da atividade da iNOS por L-NIL reduziu a nitrosação do IRβ, IRS-1, Akt e STAT3 induzida pela dieta rica em gordura (Fig. 5D). Após o último dia de tratamento com L-NIL, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente foi infundido 2µl de insulina por via intracerebroventricular. Como resultado, foi observado que o tratamento com L-NIL não alterou a fosforilação do IRβ, IRS-1 e Akt em animais controle após o estímulo com insulina, no entanto, o L-NIL promoveu aumento da fosforilação do IR, IRS-1 e Akt, bem como redução da ingestão alimentar e do peso corporal em roedores obesos estimulados com insulina quando comparado aos animais obesos tratados com veículo (Fig.5E-G). Analogamente, o tratamento com L-NIL aumentou a fosforilação do STAT3 apenas em animais obesos (Fig. 5H).

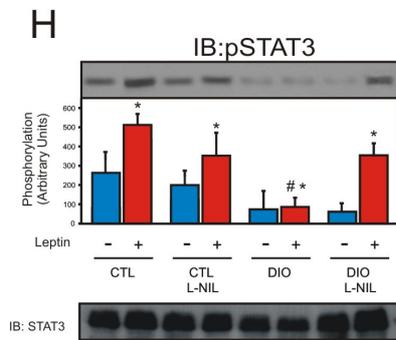
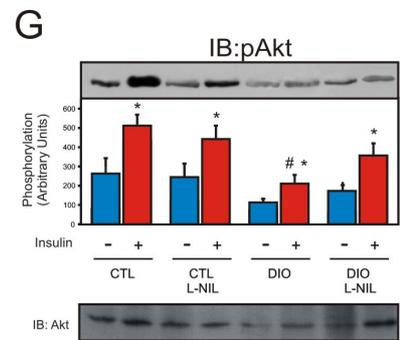
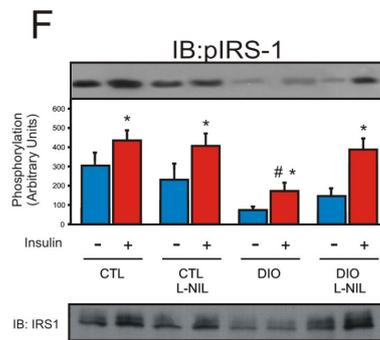
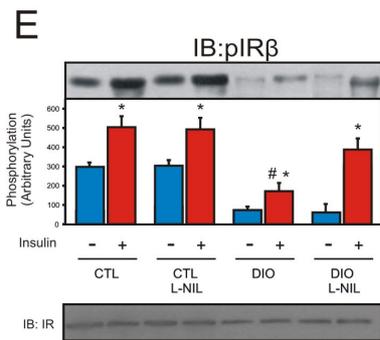
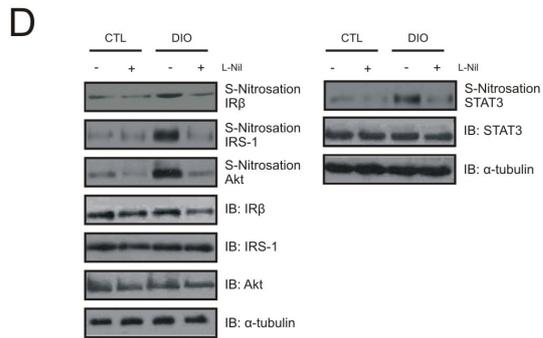
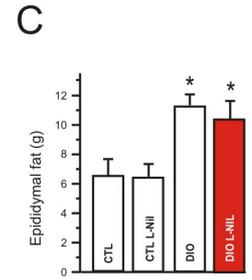
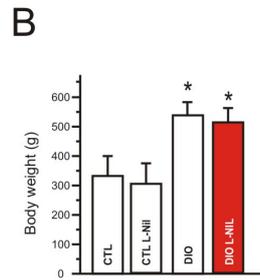
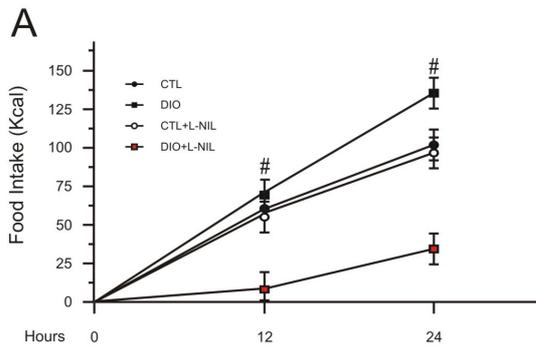


Figura 5. Efeitos do tratamento com L-NIL sobre a sensibilidade à insulina e leptina em hipotálamo ratos controle e obesos. Ratos Wistar controle e obesos foram tratados com dose diária do inibidor da iNOS (1×10^{-6} mcg em 2 μ l), o L-NIL via icv durante 7 dias. Avaliação da ingestão alimentar 12 e 24hs após o primeiro tratamento **(A)**, peso corporal **(B)** e gordura periepididimal **(C)**. Avaliação dos efeitos do L-NIL na S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(D)**. Após o último dia de tratamento com L-NIL, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente infundidos via icv insulina (200 mU em 2 μ L) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IR β **(E)**, fosforilação do IRS-1 **(F)** e da Akt **(G)**. Infusão com leptina icv (10^{-6} M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(H)**. As barras representam a média \pm EPM (erro padrão da média), # $p < 0,05$ versus demais grupos # $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Tratamento ICV com oligonucleotídeo antisense para iNOS em aumenta a sensibilidade à insulina e leptina em hipotálamo de ratos obesos.

Além da inibição farmacológica da iNOS via L-NIL lançamos mão do bloqueio genético da iNOS para dar mais robustez aos nossos achados. Dessa maneira, ratos Wistar controle e obesos foram tratados com infusão contínua do oligonucleotídeo antisense da iNOS durante 7 dias. Como pode ser observado na Figura 6A houve redução expressiva da ingestão alimentar. Conforme esperado não houve modificação do peso corporal e da gordura periepididimal após o tratamento com o oligonucleotídeo antisense da iNOS (Fig. 6B-C). A inibição da atividade da iNOS com o oligonucleotídeo antisense da iNOS reduziu a nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3 induzida pela dieta rica em gordura (Fig. 6D). Após o último dia de tratamento com o oligonucleotídeo antisense da iNOS, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente foi infundido 2 μ l de insulina por via intracerebroventricular. Como resultado, foi observado que o tratamento com o oligonucleotídeo antisense da iNOS não alterou a fosforilação do IR β , IRS-1 e Akt em animais controle após o estímulo com insulina, no entanto, o oligonucleotídeo antisense da iNOS promoveu aumento da fosforilação do IR, IRS-1 e

Akt, bem como redução da ingestão alimentar e do peso corporal em roedores obesos estimulados com insulina quando comparado aos animais obesos tratados com veículo (Fig. 6E-G). Analogamente, o tratamento com o oligonucleotídeo antisense da iNOS aumentou a fosforilação do STAT3 apenas em animais obesos (Fig. 6H).

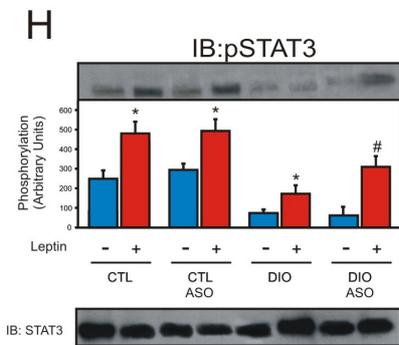
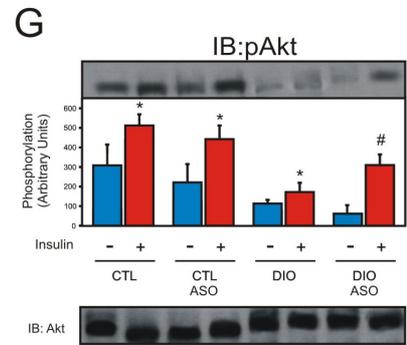
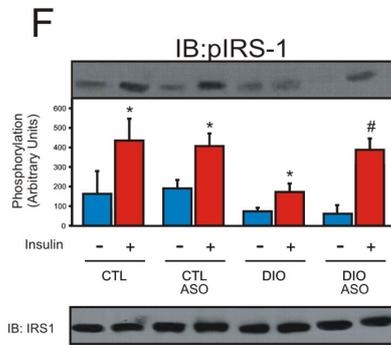
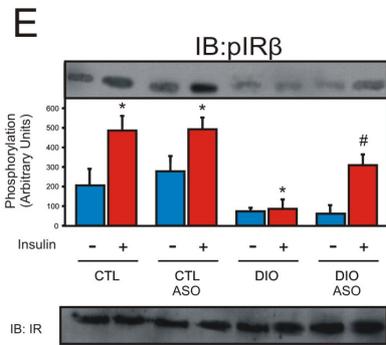
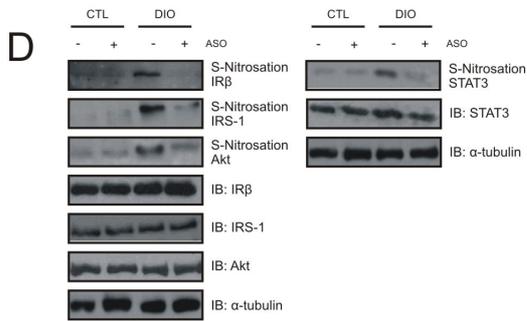
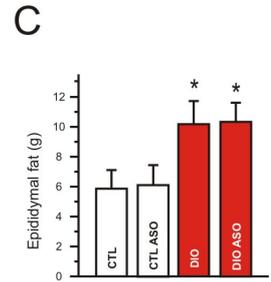
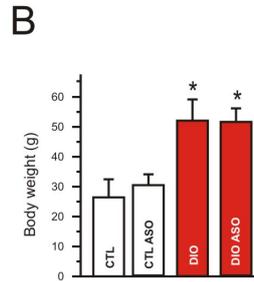
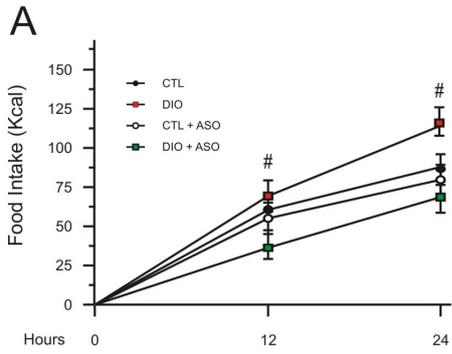


Figura 6. Efeitos do tratamento com o oligonucleotídeo antisense da iNOS sobre a S-nitrosação da via da insulina e leptina em hipotálamo ratos controle e obesos.

Ratos Wistar controle e obesos foram tratados com dose diária do antisense da iNOS ($100 \times 10^{-3} \text{M}$ em $2 \mu\text{l}$) via icv durante 7 dias. Avaliação da ingestão alimentar 12 e 24hs após o primeiro tratamento **(A)**, peso corporal **(B)** e gordura periepídidimal **(C)**. Avaliação dos efeitos do oligonucleotídeo antisense para iNOS na S-nitrosação da via da insulina (IR β , IRS-1 e Akt) e via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina **(D)**. Após o último dia de tratamento com o oligonucleotídeo antisense para iNOS, os animais ficaram em jejum durante 8 horas e posteriormente infundidos via icv insulina (200mU em $2 \mu\text{L}$) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela auto-fosforilação do IR β **(E)**, fosforilação do IRS-1 **(F)** e da Akt **(G)**. Infusão com leptina icv (10^{-6}M em $2 \mu\text{L}$) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 **(H)**. As barras representam a média \pm EPM (erro padrão da média), # $p < 0,05$ versus demais grupos # $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Tratamento com doador de NO (GSNO) intracerebroventricular induz resistência à sinalização da insulina e leptina em hipotálamo de animais nocaute para iNOS.

A infusão contínua de GSNO intracerebroventricular durante 7 dias resultou em aumento da ingestão alimentar, peso corporal, gordura periepídidimal de animais nocaute para iNOS (Fig. 7A-C). Concomitantemente a estes achados observamos aumento da nitrosação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e leptina em hipotálamo de camundongos nocaute para iNOS tratados com GSNO (Fig. 7D). Como pode ser observado na Figura 7D, a injeção intracerebroventricular de GSNO aumentou fortemente a nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3. A administração intracerebroventricular de insulina em camundongos nocaute para iNOS pré-tratados com GSNO resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina do IR β , do IRS-1 e da fosforilação em serina da Akt, quando comparados ao controle (Fig. 7E-G). A injeção intracerebroventricular de leptina em animais pré-tratados com GSNO resultou em níveis reduzidos da fosforilação em tirosina da STAT3, quando comparados ao controle (Fig. 7H).

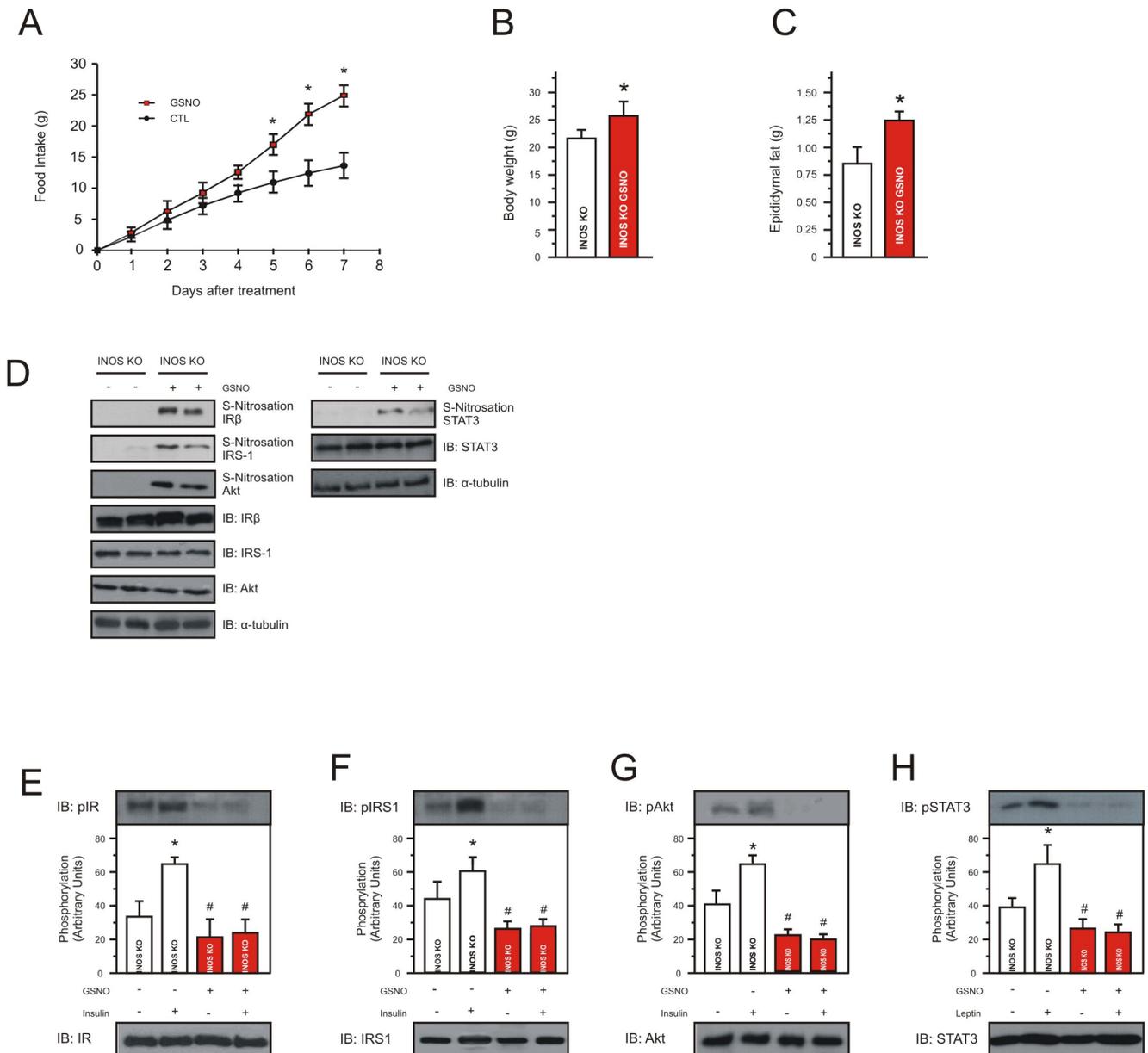


Figura 7. Efeitos do tratamento com GSNO sobre a S-nitrosação da via da insulina e leptina em hipotálamo de camundongos $INOS^{-/-}$. Avaliação da ingestão alimentar de camundongos $INOS^{-/-}$ magros de 8 semanas com implante da bomba osmótica ALZET[®] para infusão contínua icv do doador de NO S-Nitrosoglutationa (GSNO) 50 mM com fluxo 0.25µl/hora. Avaliação da ingestão alimentar durante 7 dias (**A**), peso corporal (**B**) e gordura periepídimal (**C**). Avaliação da S-nitrosação da via da insulina

(IR β , IRS-1 e Akt) e da via da leptina (STAT3) quantificado pelo método de biotina (D). Efeito do tratamento da insulina via icv (200mU em 2 μ l) e após 15 minutos foram extraídos fragmentos hipotalâmicos para avaliar atividade tirosina quinase pela autofosforilação do IR β (E), fosforilação do IRS-1 (F) e da Akt (G). Infusão com leptina icv (10⁻⁶M em 2 μ L) e extração de fragmentos hipotalâmicos após 15 minutos sobre a fosforilação em tirosina da STAT3 (H). n= 6-8 para cada grupo. *p<0,05 versus controle (Salina); # p<0,05 versus respectivo controle

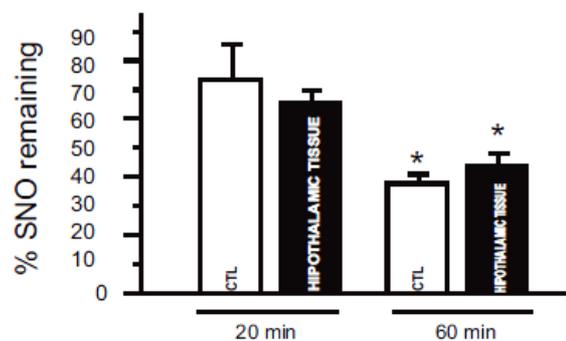


Figura Suplementar 1. Quantificação de nitritos e nitratos (NOx) em homogenato hipotalâmico após a infusão de GSNO. Os nitritos e nitratos presentes no homogenato foram quantificados, como marcadores indiretos, após a redução de NO por quimiluminescência. As proteínas do hipotálamo foram quantificadas pelo método de Biureto. *p<0,05 versus o respectivo controle.

DISCUSSÃO

A ingestão alimentar e o gasto energético são minuciosamente regulados por neurônios específicos localizados no hipotálamo. Durante as duas últimas décadas, a localização dos receptores da leptina e insulina em núcleos hipotalâmicos, bem como a descrição da via de transmissão intracelular ativadas por estes hormônios em neurônios hipotalâmicos, foram determinantes para o entendimento do controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Cada vez mais os distúrbios alimentares associados a doenças como obesidade vêm sendo diretamente relacionados com disfunções na transmissão do sinal da insulina no hipotálamo. O processo inflamatório subclínico frequentemente observado em modelos experimentais de obesidade estão diretamente associados a distintos mecanismos de resistência à insulina no hipotálamo e resultam em aumento da ingestão alimentar e ganho de peso corporal.

Atualmente, o fenômeno da S-nitrosação é considerado um importante mecanismo pós-transcricional envolvido na resistência à insulina. Acredita-se que o processo inflamatório esteja diretamente relacionado a S-nitrosação da via IR/IRS-1/Akt, via aumento da atividade da Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS), como demonstrado em modelos experimentais de obesidade e diabetes (Carvalho-Filho et al., 2005; Pauli et al., 2008). Entretanto, pouco se conhece a cerca da função deste mecanismo de sinalização na modulação da ação insulínica e leptínica no sistema nervoso central.

A S-nitrosação, ocorre pela ligação covalente do óxido nítrico com um grupamento tiol (S-H) presente em resíduos de cisteína de algumas proteínas, formando um S-nitrosotiol (S-NO) (Tartaglia et al., 1995), que compartilha muitas características em comum com a fosforilação, e modificação pós-translacional envolvida na transdução do sinal molecular, e tem sido demonstrado que regulam a função de um amplo espectro de proteínas em células intactas (Stamler et al., 2001). No presente estudo, foi demonstrado que proteínas chaves da via de sinalização da insulina e da leptina podem ser S-nitrosadas e que esta modificação pós-translacional causa resistência à ação da insulina e leptina, aumento da ingestão alimentar e diminuição do gasto energético. Interessantemente, a inibição da iNOS através de estratégias

farmacológicas (L-NIL), genéticas (oligonucleotídeo antisense) e fisiológicas (exercício físico) foram capazes de restabelecer a sensibilidade à insulina e leptina no tecido hipotalâmico. Em conjunto, estes dados sugerem que a iNOS seja uma enzima determinante do fenótipo obeso.

Inicialmente foi caracterizada a participação da S-nitrosação das proteínas envolvidas na transmissão do sinal da insulina (IR β , IRS1 e Akt) e leptina (STAT3) e em seguida como a S-nitrosação dessas proteínas poderiam contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina e leptina no hipotálamo consequentemente com a ingestão alimentar em roedores magros. Para isso, utilizamos a infusão ICV do doador de NO (GSNO), e observamos aumento da S-nitrosação do IR β . Esta modificação pós-translacional foi acompanhada por uma redução de auto-fosforilação da atividade do IR. A administração de GSNO também levou a S-nitrosação de IRS-1 e Akt. Estes dados são concordantes com dados obtidos após a administração de doadores de NO para miócitos C2C12 (Sugita et al., 2005). Analogamente, o tratamento com GSNO inibiu a sinalização da leptina ao nitrosar e inibir a fosforilação da STAT3.

Recentemente, foi descrito que o processo inflamatório sub-clínico decorrente da obesidade está presente no tecido hipotalâmico e resulta em resistência à insulina e leptina neste tecido (Carvalho et al., 2003; De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009; Ropelle et al., 2010). Embora a iNOS esteja presente neste contexto inflamatório, sua relação com a resistência à insulina e leptina no hipotálamo permanecia desconhecida. Nesse sentido, após constatar que o GSNO era capaz de induzir resistência à insulina e leptina, aumento da ingestão alimentar e redução do gasto energético, nós procuramos verificar se a obesidade estava associada com o aumento de marcadores inflamatórios como a iNOS. De forma surpreendente, observamos um grande aumento da expressão da iNOS em hipotálamo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica bem como em animais geneticamente obesos.

O próximo passo, foi determinar a influência da iNOS sobre a resistência à insulina e leptina no sistema nervoso central. Para tanto, utilizamos três estratégias para inibir a iNOS. Primeiro, foi usado uma intervenção farmacológica para reduzir a atividade da iNOS. O L-NIL atenuou a resistência à insulina e leptina em roedores obesos, constatado pelo aumento da fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e Akt após

estímulo por insulina e aumento da fosforilação do STAT3 após estímulo com leptina. Observamos também redução do peso corporal e diminuição da ingestão alimentar com o tratamento por infusão contínua com L-NIL. Segundo, os animais obesos receberam infusão crônica com o oligonucleotídeo antisense, que inibiram a transcrição da iNOS. O mesmo padrão de melhora da sinalização da insulina e leptina foram encontrados. Por fim, para certificarmos que esta modulação da iNOS ocorria também em níveis fisiológicos, os animais obesos foram submetidos a uma sessão aguda de exercício, que sabidamente reduz a inflamação hipotalâmica. Novamente, encontramos redução da nitrosação do IR, IRS-1, Akt e STAT3 e aumento da sensibilidade à insulina e leptina.

O bloqueio da NOS com antagonistas inespecíficos sabidamente diminuem a ingestão alimentar após a administração central ou periférica em animais obesos (Morley et al., 1991 ; Morley et al., 1992; Morley et al., 1994; Squadrito et al., 1993; Squadrito et al., 1994). Nosso estudo expande estes resultados ressaltando a influencia majoritária da isoforma iNOS como determinante deste clássico efeito da redução do peso corporal de animais obesos obtido com a redução do óxido nítrico a luz da fisiologia atual do controle da homeostase energética.

Em concordância com um estudo prévio nós observamos uma pequena, porém não significativa redução da ingestão alimentar após a inibição da iNOS em animais magros (Riediger et al., 2010). A princípio os resultados similares obtidos tanto com o L-NIL como com o oligonucleotídeo antisense para iNOS implicam que a inibição da iNOS ocorreu de forma específica, apenas em animais obesos e que esta inibição não está associada a efeitos colaterais significativos. Esses resultados levantam a hipótese de redução da expressão ou atividade da iNOS e, conseqüente atenuação da S-nitrosação poderia ter efeitos benéficos sobre a obesidade, a resistência à insulina e o controle de ingestão alimentar.

Assim como a inibição farmacológica e genética da iNOS o exercício físico reduziu a ingestão alimentar de animais obesos. É importante ressaltar que os efeitos anorexigênicos mediados pelo exercício foram observados de forma independente da modificação do peso corporal. Analogamente, ao uso dos inibidores da iNOS o exercício também não teve efeitos na ingestão de animais magros. O exercício físico

reverteu o aumento da expressão da iNOS e S-nitrosação do Ir β , IRS-1, Akt e STAT3 em animais obesos aumentando a sensibilidade à insulina e leptina em neurônios hipotalâmicos.

Esses resultados sugerem que a inibição da S-nitrosação das proteínas chaves da sinalização da insulina e leptina induzida pelo exercício é um fenômeno importante para a melhora da sensibilidade à insulina em animais obesos (Pauli et al., 2008). O possível mecanismo por meio do qual o exercício físico reduz a expressão de iNOS envolve a ativação IL-6 e IL-10 atenuando no tecido hipotalâmico a atividade inflamatória como o IKK β e ER, restaurando a ação central da insulina e leptina em um modelo animal de obesidade (Ropelle et al., 2010). Após o exercício, os altos níveis circulantes de IL-6 são seguidas por um aumento da IL-1RA e IL-10, e as duas últimas citocinas anti-inflamatórias pode ser induzida por IL-6 (Steensberg et al., 2003). Portanto, IL-6 induz um ambiente anti-inflamatório, culminando na produção de IL-1RA e IL-10. Entretanto, como estas citocinas reduzem a expressão da iNOS merece ser investigado futuramente de forma mais detalhada.

Um aspecto que merece destaque de nosso trabalho foi que a administração de GSNO a animais nocautes da iNOS também levou S-nitrosação do IR β , IRS-1, Akt e STAT3 e foi capaz de converter o fenótipo de baixa ingestão alimentar e alta sensibilidade insulina e leptina no hipotálamo a uma condição semelhante a da obesidade em que foi observado aumento da ingestão alimentar, peso corporal e redução da ação da insulina e leptina. Coletivamente, os resultados do nosso trabalho indicam a S-nitrosação como um fenômeno intracelular importante para desenvolvimento da resistência à insulina e à leptina no sistema nervoso central, contribuindo para o aumento da ingestão alimentar e perpetuação da obesidade.

Esses estudos favorecem a hipótese de que a inflamação de baixo grau em células do sistema nervoso central está associada a resistência à insulina e à leptina por diferentes mecanismos incluindo a S-nitrosação de proteínas das vias de sinalização desses hormônios, e que, estratégias para reduzir a atividade da iNOS, como o exercício físico, podem ser determinantes para a melhora da sensibilidade à insulina e leptina aumentando os sinais de saciedade no hipotálamo.

CONCLUSÃO

O hipotálamo é uma região do sistema nervoso central que angaria informações do status nutricional e governa a liberação de múltiplos sinais metabólicos, tais como insulina e leptina para manutenção da homeostase energética. Entretanto, a obesidade está associada com resistência à insulina e leptina no hipotálamo, além do aumento da atividade inflamatória como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Neste cenário, nossos achados mostraram que a administração crônica de GSNO intracerebroventricular em roedores magros resultou em aumento da ingestão alimentar, peso corporal e da gordura periepidual. Em concordância com estes dados os animais tratados com GSNO resultou em nitroação do receptor de insulina ($IR\beta$), substrato do receptor da insulina (IRS-1), Akt e STAT3, além da diminuição da sensibilidade da transdução do sinal da insulina e leptina no tecido hipotalâmico. Observamos também a diminuição da expressão de neuropeptídeos anorexigênicos (POMC e CART) e aumento dos orexigênicos (NPY e AgRP). Comitadamente com esses dados, animais administrados com GSNO apresentaram redução da atividade espontânea e gasto energético no período noturno. Neste cenário, a dieta hiperlipídica induziu hiperfagia, obesidade e reduziu a sensibilidade à insulina e leptina no hipotálamo. Observamos ainda aumento da expressão da iNOS e S-nitroação do $IR\beta$, IRS-1, Akt e STAT3. Estratégias de inibição farmacológica da iNOS, através do (L-NIL), genética com o (Antisense) e fisiológica através do exercício físico, atenuou a S-nitroação da via da insulina e leptina, aumentando a sensibilidade das vias e reduzindo a ingestão alimentar de roedores obesos. Coletivamente, nossos achados apontam que a S-nitroação é um importante mecanismo pós-transcricional de resistência à insulina e leptina no sistema nervoso central, contribuindo para a hiperfagia e perpetuação na gênese da obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrantes, M.M., Lamounier, J.A., and Colosimo, E.A. 2002. Overweight and obesity prevalence among children and adolescents from Northeast and Southeast regions of Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 78:335-340.
2. Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252.
3. Arnelle, D.R., and Stamler, J.S. 1995. NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* 318:279-285.
4. Bacha, F., Saad, R., Gungor, N., Janosky, J., and Arslanian, S.A. 2003. Obesity, regional fat distribution, and syndrome X in obese black versus white adolescents: race differential in diabetogenic and atherogenic risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2534-2540.
5. Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., et al. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793.
6. Banno, R., Zimmer, D., De Jonghe, B.C., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., and Bence, K.K. 2010. PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J Clin Invest* 120:720-734.
7. Baskin, D.G., Breininger, J.F., and Schwartz, M.W. 1999. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48:828-833.

8. Baskin, D.G., Wilcox, B.J., Figlewicz, D.P., and Dorsa, D.M. 1988. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 11:107-111.
9. Baskin, M.L., Ard, J., Franklin, F., and Allison, D.B. 2005. Prevalence of obesity in the United States. *Obes Rev* 6:5-7.
10. Baumann, H., Morella, K.K., White, D.W., Dembski, M., Bailon, P.S., Kim, H., Lai, C.F., and Tartaglia, L.A. 1996. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8374-8378.
11. Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Jr., Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., and Schwartz, M.W. 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92:1824-1830.
12. Bedard, S., Marcotte, B., and Marette, A. 1997. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325 (Pt 2):487-493.
13. Belgardt, B.F., Mauer, J., Wunderlich, F.T., Ernst, M.B., Pal, M., Spohn, G., Bronneke, H.S., Brodesser, S., Hampel, B., Schauss, A.C., et al. 2010. Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6028-6033.
14. Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G., and Kahn, B.B. 2006. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 12:917-924.
15. Bi, S., Scott, K.A., Hyun, J., Ladenheim, E.E., and Moran, T.H. 2005. Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka long-evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. *Endocrinology* 146:1676-1685.

16. Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., and Flier, J.S. 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619-625.
17. Blackburn, G.L. 2001. Pasteur's Quadrant and malnutrition. *Nature* 409:397-401.
18. Boaz, M., Lisy, L., Zandman-Goddard, G., and Wainstein, J. 2009. The effect of anti-inflammatory (aspirin and/or statin) therapy on body weight in Type 2 diabetic individuals: EAT, a retrospective study. *Diabet Med* 26:708-713.
19. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916.
20. Brune, B., and Zhou, J. 2003. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr Med Chem* 10:845-855.
21. Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
22. Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., and Considine, R.V. 1996. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348:159-161.
23. Carpenter, L.R., Farruggella, T.J., Symes, A., Karow, M.L., Yancopoulos, G.D., and Stahl, N. 1998. Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6061-6066.

24. Carroll, S., and Dudfield, M. 2004. What is the relationship between exercise and metabolic abnormalities? A review of the metabolic syndrome. *Sports Med* 34:371-418.
25. Carvalheira, J.B., and Saad, M.J. 2006. [Insulin resistance/hyperinsulinemia associated diseases not included in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:360-367.
26. Carvalheira, J.B., Ribeiro, E.B., Araujo, E.P., Guimaraes, R.B., Telles, M.M., Torsoni, M., Gontijo, J.A., Velloso, L.A., and Saad, M.J. 2003. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46:1629-1640.
27. Carvalheira, J.B., Siloto, R.M., Ignacchitti, I., Brenelli, S.L., Carvalho, C.R., Leite, A., Velloso, L.A., Gontijo, J.A., and Saad, M.J. 2001. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500:119-124.
28. Carvalho-Filho, M.A., Ueno, M., Hirabara, S.M., Seabra, A.B., Carvalheira, J.B., de Oliveira, M.G., Velloso, L.A., Curi, R., and Saad, M.J. 2005. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54:959-967.
29. Chandra, R.K. 1996. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14304-14307.
30. Cheung, C.C., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. 1997. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492.
31. Cintra, D.E., Ropelle, E.R., and Pauli, J.R. 2007. [Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin, leptin and physical exercise]. *Rev Neurol* 45:672-682.

32. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., et al. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295.
33. Da Silva, B.A., Bjorbaek, C., Uotani, S., and Flier, J.S. 1998. Functional properties of leptin receptor isoforms containing the *gln³¹¹→pro* extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology* 139:3681-3690.
34. Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. 2004. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25:4-7.
35. Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., and Murad, F. 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:203-236.
36. De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., and Velloso, L.A. 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192-4199.
37. De Vos, P., Saladin, R., Auwerx, J., and Staels, B. 1995. Induction of *ob* gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270:15958-15961.
38. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.
39. Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., and Levy, D.E. 1996. Targeted disruption of the mouse *Stat1* gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84:443-450.

40. El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjorbaek, C., and Flier, J.S. 2000. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105:1827-1832.
41. Fam, B.C., Morris, M.J., Hansen, M.J., Kebede, M., Andrikopoulos, S., Proietto, J., and Thorburn, A.W. 2007. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab* 9:840-852.
42. Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165-168.
43. Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Kamath, S., Jones, S., Gibson, W.T., Trussell, R., Jebb, S.A., Lip, G.Y., and O'Rahilly, S. 2001. Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature* 414:34-35.
44. Flores, M.B., Fernandes, M.F., Ropelle, E.R., Faria, M.C., Ueno, M., Velloso, L.A., Saad, M.J., and Carvalheira, J.B. 2006. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes* 55:2554-2561.
45. Foster, M.W., McMahon, T.J., and Stamler, J.S. 2003. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9:160-168.
46. Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B.B., and Flier, J.S. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314.
47. Friedman, J.M., and Halaas, J.L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.

48. Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H., and Skoda, R.C. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6231-6235.
49. Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P., et al. 1984. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312:721-724.
50. Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J.W., Liddington, R.C., and Lipton, S.A. 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297:1186-1190.
51. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.
52. Handschin, C., and Spiegelman, B.M. 2008. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 454:463-469.
53. Havel, P.J., Uriu-Hare, J.Y., Liu, T., Stanhope, K.L., Stern, J.S., Keen, C.L., and Ahren, B. 1998. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 274:R1482-1491.
54. Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M.J. 1979. Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J Clin Invest* 64:636-642.
55. Heldin, C.H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223.

56. Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:150-166.
57. Hogg, N. 1999. The kinetics of S-transnitrosation--a reversible second-order reaction. *Anal Biochem* 272:257-262.
58. Hogg, N. 2002. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:585-600.
59. Hotamisligil, G.S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
60. Hotamisligil, G.S., and Erbay, E. 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8:923-934.
61. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
62. Hotamisligil, S., Toner, M., and Powers, R.D. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 55:161-168.
63. Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzamelis, I., Bjorbaek, C., and Flier, J.S. 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10:734-738.
64. Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. 2001. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001:PL1.
65. Kahn, S.E., Prigeon, R.L., McCulloch, D.K., Boyko, E.J., Bergman, R.N., Schwartz, M.W., Neifing, J.L., Ward, W.K., Beard, J.C., Palmer, J.P., et al. 1993. Quantification of

the relationship between insulin sensitivity and beta- cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42:1663-1672.

66. Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C.H., and Marette, A. 1997. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46:1691-1700.
67. Kasuga, M., Karlsson, F.A., and Kahn, C.R. 1982. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185-187.
68. Katsuki, A., Sumida, Y., Murashima, S., Murata, K., Takarada, Y., Ito, K., Fujii, M., Tsuchihashi, K., Goto, H., Nakatani, K., et al. 1998. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83:859-862.
69. Khovidhunkit, W., Kim, M.S., Memon, R.A., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45:1169-1196.
70. Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76.
71. Kurrek, M.M., Zapol, W.M., Holzmann, A., Filippov, G., Winkler, M., and Bloch, K.D. 1995. In vivo lipopolysaccharide pretreatment inhibits cGMP release from the isolated-perfused rat lung. *Am J Physiol* 269:L618-624.
72. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

73. Lang, C.H., Dobrescu, C., and Bagby, G.J. 1992. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130:43-52.
74. Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., and Friedman, J.M. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635.
75. Leinriders, A., Schenten, D., Konner, A.C., Belgardt, B.F., Mauer, J., Okamura, T., Wunderlich, F.T., Medzhitov, R., and Bruning, J.C. 2009. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab* 10:249-259.
76. Licinio, J., and Wong, M.L. 1997. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J Clin Invest* 100:2941-2947.
77. Liu, X., Miller, M.J., Joshi, M.S., Thomas, D.D., and Lancaster, J.R., Jr. 1998. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2175-2179.
78. Liu, Z., Rudd, M.A., Freedman, J.E., and Loscalzo, J. 1998. S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 284:526-534.
79. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., et al. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161.
80. Mannick, J.B., and Schonhoff, C.M. 2002. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch Biochem Biophys* 408:1-6.

81. Marette, A., Mauriege, P., Marcotte, B., Atgie, C., Bouchard, C., Theriault, G., Bukowiecki, L.J., Marceau, P., Biron, S., Nadeau, A., et al. 1997. Regional variation in adipose tissue insulin action and GLUT4 glucose transporter expression in severely obese premenopausal women. *Diabetologia* 40:590-598.
82. Margolis, R.U., and Altszuler, N. 1967. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 215:1375-1376.
83. Marshall, H.E., and Stamler, J.S. 2001. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 40:1688-1693.
84. Martinez-Ruiz, A., and Lamas, S. 2004. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* 62:43-52.
85. Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., et al. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033.
86. Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., et al. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-442.
87. Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., and Trayhurn, P. 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387:113-116.
88. Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., et al. 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.

89. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903-908.
90. Moraes, J.C., Amaral, M.E., Picardi, P.K., Calegari, V.C., Romanatto, T., Bermudez-Echeverry, M., Chiavegatto, S., Saad, M.J., and Velloso, L.A. 2006. Inducible-NOS but not neuronal-NOS participate in the acute effect of TNF-alpha on hypothalamic insulin-dependent inhibition of food intake. *FEBS Lett* 580:4625-4631.
91. Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carvalheira, J.B., Oliveira, A.L., Saad, M.J., et al. 2009. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 4:e5045.
92. Morley, J.E., and Flood, J.F. 1991. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* 49:707-711.
93. Morley, J.E., and Flood, J.F. 1992. Competitive antagonism of nitric oxide synthetase causes weight loss in mice. *Life Sci* 51:1285-1289.
94. Morley, J.E., and Flood, J.F. 1994. Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am J Physiol* 266:R164-168.
95. Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
96. Munzberg, H., Flier, J.S., and Bjorbaek, C. 2004. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145:4880-4889.

97. Myers, M.G., Cowley, M.A., and Munzberg, H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70:537-556.
98. Nedospasov, A., Rafikov, R., Beda, N., and Nudler, E. 2000. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13543-13548.
99. Niswender, K.D., Morton, G.J., Stearns, W.H., Rhodes, C.J., Myers, M.G., Jr., and Schwartz, M.W. 2001. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413:794-795.
100. Ogden, C.L., Carroll, M.D., Curtin, L.R., McDowell, M.A., Tabak, C.J., and Flegal, K.M. 2006.
101. Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G., Jr., and Ozcan, U. 2009. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9:35-51.
102. Pauli, J.R., Ropelle, E.R., Cintra, D.E., Carvalho-Filho, M.A., Moraes, J.C., De Souza, C.T., Velloso, L.A., Carvalheira, J.B., and Saad, M.J. 2008. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* 586:659-671.
103. Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.
104. Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., and Goeddel, D.V. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.

105. Perreault, M., and Marette, A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7:1138-1143.
106. Petersen, A.M., and Pedersen, B.K. 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98:1154-1162.
107. Picardi, P.K., Calegari, V.C., Prada Pde, O., Moraes, J.C., Araujo, E., Marcondes, M.C., Ueno, M., Carvalheira, J.B., Velloso, L.A., and Saad, M.J. 2008. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 149:3870-3880.
108. Pickup, J.C. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813-823.
109. Piercy, V., Toseland, C.D., and Turner, N.C. 1998. Potential benefit of inhibitors of advanced glycation end products in the progression of type II diabetes: a study with aminoguanidine in C57/BLKsJ diabetic mice. *Metabolism* 47:1477-1480.
110. Plum, L., Schubert, M., and Bruning, J.C. 2005. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16:59-65.
111. Polonsky, K.S., Given, B.D., and Van Cauter, E. 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81:442-448.
112. Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., et al. 2009. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1003-1012.
113. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 295:1549-1555.

114. Ribiere, C., Jaubert, A.M., Gaudiot, N., Sabourault, D., Marcus, M.L., Boucher, J.L., Denis-Henriot, D., and Giudicelli, Y. 1996. White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem Biophys Res Commun* 222:706-712.
115. Riediger, T., Cordani, C., Potes, C.S., and Lutz, T.A. 2010. Involvement of nitric oxide in lipopolysaccharide induced anorexia. *Pharmacol Biochem Behav* 97:112-120.
116. Ropelle, E.R., Fernandes, M.F., Flores, M.B., Ueno, M., Rocco, S., Marin, R., Cintra, D.E., Velloso, L.A., Franchini, K.G., Saad, M.J., et al. 2008. Central exercise action increases the AMPK and mTOR response to leptin. *PLoS One* 3:e3856.
117. Ropelle, E.R., Flores, M.B., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Pauli, J.R., Morari, J., de Souza, C.T., Moraes, J.C., Prada, P.O., Guadagnini, D., et al. 2010. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 8.
118. Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Prada, P.O., de Souza, C.T., Picardi, P.K., Faria, M.C., Cintra, D.E., Fernandes, M.F., Flores, M.B., Velloso, L.A., et al. 2006. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol* 577:997-1007.
119. Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D.Y., Ko, H.J., Ong, H., Morel, C., Mora, A., Reilly, J., Kim, J.K., et al. 2010. Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes Dev* 24:256-264.
120. Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., and Auwerx, J. 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529.

121. Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
122. Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J.M. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118:2992-3002.
123. Schwartz, M.W., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., Nicolson, M., Moore, J., Morawiecki, A., Boyko, E.J., and Porte, D., Jr. 1997. Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care* 20:1476-1481.
124. Shepherd, P.R., Nave, B.T., and Siddle, K. 1995. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* 305 (Pt 1):25-28.
125. Shimabukuro, M., Ohneda, M., Lee, Y., and Unger, R.H. 1997. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J Clin Invest* 100:290-295.
126. Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., et al. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-633.
127. Shkoda, A., Ruiz, P.A., Daniel, H., Kim, S.C., Rogler, G., Sartor, R.B., and Haller, D. 2007. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology* 132:190-207.
128. Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801.

129. Shutter, J.R., Graham, M., Kinsey, A.C., Scully, S., Luthy, R., and Stark, K.L. 1997. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11:593-602.
130. Sipols, A.J., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. 1995. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44:147-151.
131. Squadrito, F., Calapai, G., Altavilla, D., Cucinotta, D., Zingarelli, B., Arcoraci, V., Campo, G.M., and Caputi, A.P. 1994. Central serotonergic system involvement in the anorexia induced by NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 255:51-55.
132. Squadrito, F., Calapai, G., Cucinotta, D., Altavilla, D., Zingarelli, B., Iocolano, M., Urna, G., Sardella, A., Campo, G.M., and Caputi, A.P. 1993. Anorectic activity of NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol* 230:125-128.
133. Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. 2001. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675-683.
134. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., and Loscalzo, J. 1992. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:444-448.
135. Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Moller, K., and Pedersen, B.K. 2003. IL-6 enhances plasma IL-1RA, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E433-437.

136. Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A., et al. 1995. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377:530-532.
137. Sugita, H., Fujimoto, M., Yasukawa, T., Shimizu, N., Sugita, M., Yasuhara, S., Martyn, J.A., and Kaneki, M. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280:14203-14211.
138. Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Tartaglia, L.A. 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096.
139. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271.
140. Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Jul;285(1):E216-23.
141. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
142. Tsukumo, D.M., Carvalho-Filho, M.A., Carvalheira, J.B., Prada, P.O., Hirabara, S.M., Schenka, A.A., Araujo, E.P., Vassallo, J., Curi, R., Velloso, L.A., et al. 2007. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998.
143. Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Jr., Stoffel, M., and Friedman, J.M. 1996. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice.

144. Van der Poll, T., Romijn, J.A., Endert, E., Borm, J.J., Buller, H.R., and Sauerwein, H.P. 1991. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol* 261:E457-465.
145. Velloso, L.A. 2003. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E216-223.
146. Velloso, L.A., Araujo, E.P., and de Souza, C.T. 2008. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 15:189-193.
147. Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119.
148. White, C.L., Whittington, A., Barnes, M.J., Wang, Z., Bray, G.A., and Morrison, C.D. 2009. HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E291-299.
149. White, M.F. 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17.
150. Williams, J.G., Pappu, K., and Campbell, S.L. 2003. Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6376-6381.
151. Wink, D.A., Darbyshire, J.F., Nims, R.W., Saavedra, J.E., and Ford, P.C. 1993. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 6:23-27.

152. Wink, D.A., Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Laval, F., Laval, J., Cook, J.A., Krishna, M.C., et al. 1994. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 7:519-525.
153. Winkler, G., Salamon, F., Salamon, D., Speer, G., Simon, K., and Cseh, K. 1998. Elevated serum tumour necrosis factor-alpha levels can contribute to the insulin resistance in Type II (non-insulin-dependent) diabetes and in obesity. *Diabetologia* 41:860-861.
154. Wisse, B.E., Kim, F., and Schwartz, M.W. 2007. Physiology. An integrative view of obesity. *Science* 318:928-929.
155. Woods, S.C., Chavez, M., Park, C.R., Riedy, C., Kaiyala, K., Richardson, R.D., Figlewicz, D.P., Schwartz, M.W., Porte, D., Jr., and Seeley, R.J. 1996. The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 20:139-144.
156. Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., and Porte, D., Jr. 1979. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
157. Woods, S.C., Porte, D., Jr., Bobbioni, E., Ionescu, E., Sauter, J.F., Rohner-Jeanrenaud, F., and Jeanrenaud, B. 1985. Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight. *Am J Clin Nutr* 42:1063-1071.
158. Xu, A.W., Kaelin, C.B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M.W., and Barsh, G.S. 2005. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115:951-958.

159. Yang, L., and Hotamisligil, G.S. 2008. Stressing the brain, fattening the body. *Cell* 135:20-22.
160. Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-630.
161. Zabolotny, J.M., Kim, Y.B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G., and Kahn, B.B. 2008. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 283:14230-14241.
162. Zhang, X., Dong, F., Ren, J., Driscoll, M.J., and Culver, B. 2005. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 191:318-325.
163. Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. 2008. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135:61-73.