

PATY KAROLL PICARDI

**Redução hipotalâmica da PTP-1B melhora a sensibilidade à
insulina e leptina em ratos normais e obesos**

CAMPINAS

2007

PATY KAROLL PICARDI

**Redução hipotalâmica da PTP-1B melhora a sensibilidade à
insulina e leptina em ratos normais e obesos**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P58r Picardi, Paty Karoll
Redução hipotalâmica da PTB-1B melhora a sensibilidade à insulina e leptina em ratos normais e obesos / Paty Karoll Picardi. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador :Mário José Abdalla Saad
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Insulina. 2. Leptina. 3. Proteína tirosina fosfatase. I. Saad, Mário José Abdalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Reduction hypothalamic of PTP-1B improves the sensibility to the insulin and leptin in normal and obese rats

Keywords: • Insulin
• Leptin
• Protein Tyrosine phosphatase

Titulação: Doutorado em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof Dr Mário José Abdalla Saad
Prof Dr Márcio Pereira da Silva
Prof Dr Antônio Carlos Boschero
Prof Dr Eduardo Melani Rocha
Prof Dr Sigisfredo Luis Brenelli**

Data da defesa: 27-02-2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): *Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) . Marcio Pereira da Silva

Marcio Pereira da Silva

2. Prof(a). Dr(a). Eduardo Melnai Rocha

Eduardo Melnai Rocha

3. Prof(a). Dr(a). Antonio Carlos Boschero

Antonio Carlos Boschero

4. Prof(a). Dr(a). Sigisfredo Luis Brenelli

Sigisfredo Luis Brenelli

5. Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad

Mário José Abdalla Saad

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

Data: 27/02/2007

DEDICATÓRIA

A meus pais, Antônio e Célia, pelo seu amor, apoio e por todos esses anos de dedicação e a meus irmãos, Larissa e Alyson, meus melhores amigos

A Deus pela vida...

Ao Dr Mário, por me receber de braços abertos, pelos ensinamentos, paciência, dedicada orientação, incentivo, compreensão e por compartilhar comigo sua grande sabedoria, certamente uma pessoa iluminada.

Aos Prof. Dr. Lício e Dr José Barreto pela atenção e ensinamentos na realização desse trabalho.

À Vivian, pelo companheirismo, constante colaboração e, principalmente pela grande amizade nos momentos felizes e difíceis, sempre ao meu lado, com certeza mais que uma amiga.

À Talita, Marciane e Andressa, amigas especiais, que estão sempre ao meu lado, dispostas a ajudar e que alegram a minha vida.

À Patrícia pela amizade e contribuição nesse trabalho.

À Juliana por tantas canulações juntas e a Eliana pela colaboração nesse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório, em especial Joseane, Èrika, Adriana, Maristela, Graziela, Mirella, Maria Fernanda, Leandro, Rodrigo, Eli e Dennys.

Ao Márcio, Sr. Luiz, Sr Jósimo e Antônio pela dedicação e por serem tão prestativos comigo.

Ao Áureo uma pessoa especial, por estar ao meu lado e me fazer feliz nesse momento.

À Capes e Fapesp pelo auxílio financeiro.

A todos os animais que contribuíram com esse trabalho com o sacrifício de suas vidas.

	PÁG.
RESUMO	<i>xi</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
INTRODUÇÃO	15
Mecanismos moleculares de ação da insulina e leptina no hipotálamo.....	16
PTP-1B como uma reguladora negativa da ação da leptina e insulina.....	21
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS	26
Anticorpos, reagentes químicos e materiais.....	27
Animais e procedimentos cirúrgicos.....	27
Tratamento com o oligonucleotídeo.....	28
Determinação da massa de tecido epididimal e retroperitoneal.....	29
Determinação das concentrações de insulina e leptina.....	29
Avaliação da ingestão alimentar.....	29
Dissecção do hipotálamo.....	29
Imunoprecipitação.....	30
Imunoblotting.....	30
Imunoistoquímica.....	31
Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico.....	32
Ensaio da Atividade proteína tirosina fosfatase 1B.....	33
Análise estatística.....	33

RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

^{125}I	Isótopo de iodo 125
2- [^{14}C]DG1	2-deoxi-D- [^{14}C] glicose
3H	Trício
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
AKT	Proteína serina quinase
ASO	Oligonucleotídeo antisense
ATP	Adenosina trifosfato
Blast	Ferramenta de pesquisa de alinhamento
BSA	Soro de Albumina Bovina
Camundongos ob/ob	Camundongo obeso que apresenta mutação do gene que codifica a leptina
CART	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DIO	Obesidade induzida pela dieta
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HPLC	Cromatografia líquida por alta pressão
ICV	Intracerebroventricular
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato 2 do receptor de insulina
Jak-2	Janus quinase-2
LH	Hipotálamo lateral

MAPK	Proteína quinase ativadora mitogênica
MCH	Hormônio concentrador de melanina
NPY	Neuropeptídeo Y
Obr	Receptor de leptina
PI	Fosfatidilinositol
PI _{3,4,5} -P ₃	Fosfatidilinositol-trifosfato
PI _{3,4} -P ₂	Fosfatidilinositol-bifosfato
PI3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP	Fosfoinositóis fosforilados
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfona
POMC	Pro-opiomelanocortina
Pp60 ^{src}	Peptídeo fosforegulatório C-terminal
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase
PTPases	Proteínas tirosinas fosfatasas
PVN	Núcleo paraventricular
pY	Fosfotirosina
Rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SHP2	Proteína tirosina fosfatase que contém domínio SH2
Stat	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TRH	Hormônio liberador de tirotrófina
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
α-MSH	Hormônio estimulador de α melanocítico
μCi	MicroCuri

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Avaliação da expressão e localização da PTP1B em hipotálamo de ratos após o tratamento com oligonucleotídeo antisense PTP1B.....	36
Figura 2- Efeito da redução hipotalâmica da PTP1B sob parâmetros metabólicos.....	38
Figura 3- Avaliação da redução da PTP1B sob a saciedade e sinalização da leptina.....	41
Figura 4- Avaliação da redução da PTP1B sob a sinalização e saciedade induzida pela insulina.....	43
Figura 5- Avaliação do efeito da redução hipotalâmica da PTP1B sob o metabolismo de glicose.....	45
Figura 6- Avaliação da redução da PTP1B sob a atividade PTPase e PTP1B.....	47

RESUMO



A proteína tirosina fosfatase (PTP1B) tem sido implicada na regulação negativa da sinalização da insulina e leptina. Camundongos knockout para PTP1B são mais sensíveis à insulina e leptina e resistentes à obesidade quando alimentados com uma dieta rica em gordura. Investigamos também a função da PTP1B hipotalâmica na regulação da ingestão alimentar ações da insulina e leptina e sinalização em ratos através de um seletivo decréscimo na expressão da PTP1B. Geramos uma redução seletiva e transiente redução da PTP1B através da infusão de um oligonucleotídeo antisense, para bloquear a expressão da PTP1B em áreas hipotalâmicas de ratos ao redor do terceiro ventrículo, em ratos-controle e obesos. A diminuição seletiva da PTP1B hipotalâmica resultou em diminuição da ingestão alimentar, redução do peso corporal, da adiposidade, dos níveis de leptina após uma alimentação rica em gordura. Ainda melhorou a ação e sinalização da leptina e insulina no hipotálamo e também a ação da insulina em fígado e músculo. Nossos resultados mostram que a redução da PTP1B hipotalâmica pode ser suficiente para promover redução apreciável do peso corporal, melhora na sensibilidade e sinalização da insulina e leptina e na homeostase da glicose em ratos DIO.

ABSTRACT



Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) has been implicated in the negative regulation of insulin and leptin signaling. PTP1B knockout mice are hypersensitive to insulin and leptin and resistant to obesity when fed a high-fat diet. We investigated the role of hypothalamic PTP1B in the regulation of food intake, insulin and leptin actions and signaling in rats through selective decreases in PTP1B expression in discrete hypothalamic nuclei. We generated a selective, transient reduction in PTP1B by infusion of an antisense oligonucleotide designed to blunt the expression of PTP1B in rat hypothalamic areas surrounding the third ventricle, in control and obese rats. The selective decrease in hypothalamic PTP1B resulted in decreased food intake, reduced body weight, reduced adiposity and reduced leptin levels after high-fat feeding, improved leptin and insulin action and signaling in hypothalamus and also in insulin action in liver and muscle. Our results show that hypothalamic PTP1B reduction should be sufficient to promote appreciable weight reduction and improve insulin and leptin sensitivity and signaling and glucose homeostasis in DIO rats.

INTRODUÇÃO



Obesidade é um estado metabólico no qual um excesso de gordura é acumulado nos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo branco, músculo e fígado. O desenvolvimento da obesidade tem conseqüências importantes sobre a vida dos indivíduos afetados, causando desde sintomas fisiológicos discretos até sérias morbidades que podem comprometer a qualidade e a expectativa de vida (Horvath, 2005). A obesidade é o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças como diabetes mellitus tipo 2, doenças coronarianas, acidente vascular cerebral e alguns tipos de câncer como o de mama e o de cólon (Marx, 2003). Além destes problemas, a obesidade está associada a complicações respiratórias como apnéia do sono e à osteoartrose de grandes e pequenas articulações (Kopelman, 2000).

A obesidade é resultante da combinação de fatores como susceptibilidade genética, aumento da disponibilidade e do consumo de alimentos calóricos, diminuição da prática de atividade física, e inúmeros fatores de ordem psicossocial. (Kopelman, 2000).

Não obstante a universalização dos estudos sobre a obesidade, seu mecanismo molecular permanece amplamente desconhecido. Evidências recentes sugerem uma função importante para o cérebro no controle do conteúdo de gordura corporal e metabolismo de glicose. Sistemas neuronais que regulam estoque de substratos calóricos, gasto energético e produção endógena de glicose são sensíveis e respondem a sinais hormonais e nutricionais, os quais dão informações sobre a energia disponível e os estoques de energia corporal. Em resposta a esses sinais mudanças adaptativas ocorrem e promovem a homeostase energética (ingestão alimentar e gasto energético) e a manutenção dos níveis de glicose. Alterações na sinalização neuronal em resposta a sinais hormonais (insulina e leptina) ou nutricionais que controlam a homeostase energética, estão associadas a obesidade (Schwartz and Porte, 2005).

Mecanismos moleculares de ação da insulina e leptina no hipotálamo

A leptina é um hormônio com características estruturais de citocina produzida predominantemente pelo tecido adiposo branco em relação proporcional direta à massa corporal deste tecido (Zhang et al., 1994). A sinalização da leptina depende de sua ligação a

um receptor monomérico transmembrana da família dos receptores de citocina da classe I (Tartaglia et al., 1995). Como outros membros da família de receptores da classe I de citocinas o Obr (receptor de leptina) não possui atividade catalítica intrínseca sendo constitutivamente ligado a uma proteína citosólica com atividade tirosina quinase chamada Janus quinase - 2 (Jak-2) (Bjorbaek et al., 1997).

A ligação da leptina ao seu receptor promove o recrutamento de outra unidade de receptor que se encontra nas adjacências formando assim uma estrutura transitoriamente dimérica (Zabeau et al., 2003). A modificação conformacional induzida pela ligação da leptina e pela dimerização de receptores induz a atividade catalítica da enzima Jak-2 associada, a qual se autofosforila em vários resíduos tirosina tornando-se assim ativa para que a seguir fosforilar e ativar a outra molécula de Jak-2 ligada ao segundo receptor (Tartaglia, 1997). Após ativadas as Jak-2 catalisam a fosforilação dos receptores Obr nas tirosinas 985 e 1138 (Munzberg et al., 2005). Desta forma criam-se três sítios ativos que darão continuidade ao sinal da leptina, sendo estes a própria molécula de Jak-2 fosforilada e as regiões próximas às tirosinas 985 e 1138 fosforiladas do Obr. Através destes sítios o complexo Obr/Jak-2 recrutam pelo menos três vias distintas de sinalização intracelular, IRS/PI3-quinase, SHP-2/MAP-quinase e Stat, as quais serão responsáveis pela modulação de fenômenos fisiológicos controlados pela leptina como a produção e liberação de neurotransmissores responsáveis pelo controle da fome (Bjorbaek and Kahn 2004).

Os avanços na caracterização dos mecanismos de ação da leptina no hipotálamo logo revelaram que a transdução do sinal deste hormônio sofre controle importante por vias paralelas de sinalização celular, sendo que, até o presente momento, a insulina se destaca como o principal modulador do sinal da leptina (Carvalho et al., 2001).

Diferente da leptina, os mecanismos moleculares de sinalização da insulina tem sido estudados de forma mais intensa desde o início da década de 1980 quando se caracterizou a atividade tirosina quinase intrínseca do seu receptor (IR) (Kasuga et al., 1982). Não existem diferenças estruturais entre o IR expresso em tecidos periféricos e no sistema nervoso central (Saltiel and Kahn, 2001). O receptor de insulina (IR) é uma molécula hetero-tetramérica, composta de duas subunidades α , unidas a duas subunidades β através de pontes dissulfeto. As subunidades α estão localizadas na porção

extracelular da membrana e possuem o sítio de ligação para a insulina, enquanto as subunidades β são transmembranares e detêm a atividade tirosina quinase do receptor. A ligação da insulina à subunidade α induz a fosforilação de uma complexa cascata de resíduos de tirosina na subunidade β . 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, 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, 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, incluindo IRS-1 e IRS-2 (Carvalheira et al., 2001; Torsoni et al., 2003). Aqui, como no caso da leptina, o IRS-2 parece desempenhar um função predominante, o que pode ser explicado em parte pela sua expressão preferencial em regiões que possuem maior número de neurônios que portam o IR (Torsoni et al., 2003). A fosforilação de IRSs promove a ligação e ativação da enzima PI3-quinase (fosfatidilinositol 3-quinase) (Torsoni et al., 2003; Carvalheira, 2003) que, como no caso da leptina, conecta o sinal da insulina ao controle do ritmo de disparos neuronais (Xu et al., 2005), o que é condicionado à inativação de canais de potássio ATP-dependentes (Plum et al., 2005). Através do controle do ritmo de disparos neuronais a insulina modula, em paralelo à leptina, a liberação de neurotransmissores nas sinapses efetoras (Plum et al., 2005). De acordo com uma série de estudos recentes, a enzima (PI3-quinase) apresenta uma função central atuando como mediadora dos sinais anorexigênicos da insulina e leptina nos neurônios POMC e CART atuando como elo no *cross-talk* neuronal entre a sinalização destes hormônios (Carvalheira, 2003; Carvalheira, 2005; Niswender et al., 2003; Xu et al., 2005).

Na via clássica de sinalização da insulina, a PI3-quinase é ativada em seguida à ativação do receptor de insulina (IR) e do recrutamento dos substratos 1 (IRS1) e 2 (IRS2) (Folli 1992 e Velloso 1996) do IR. A PI3-quinase apresenta uma função importante em numerosos processos biológicos, incluindo sobrevivência celular, migração, atividade metabólica, proliferação, e diferenciação, sendo que para todos esses efeitos, a geração de

um segundo mensageiro de membrana é necessária. A geração de tal mensageiro depende da atividade catalítica da enzima utilizando como substrato fosfoinositol (PI) de membrana. Uma vez ativada, a PI3-quinase catalisa a incorporação de fosfato na posição 3' de PIs, podendo gerar PI3,4P2 ou PI3,4,5P3. Estes PIs fosforilados servem como sítios de ligação para proteínas que conduzem o sinal cascata-abaxio, sendo estas as proteínas PDK e AKT (Cantley, 2002).

A segunda via depende da ativação da enzima Jak-2. Apesar de possuir atividade tirosina quinase intrínseca o IR é capaz de interagir e ativar a Jak-2 em vários tecidos, inclusive no hipotálamo (Carvalho et al., 2001; Saad et al., 1996). Uma vez fosforilada e ativada a Jak-2 recruta e fosforila Stat-3 a qual conecta o sinal da insulina ao controle da transcrição de genes de neurotransmissores envolvidos com o controle da fome e da termogênese (Carvalho et al., 2001). É importante ressaltar, entretanto, que a ativação da transcrição gênica pela insulina através de Stat-3 só é efetiva na presença da leptina (Carvalho et al., 2001).

Na última década, as expressões de Obr e IR no sistema nervoso central foram avaliadas por vários grupos que observaram que, apesar de ambos os receptores serem encontrados em múltiplas e distintas regiões do cérebro, a presença no hipotálamo, e mais especificamente no núcleo arqueado, é a mais marcante (Tartaglia 1997; Torsoni et al., 2003). Até o presente, duas subpopulações de neurônios foram bem caracterizadas no núcleo arqueado. Uma expressa os neurotransmissores orexigênicos NPY e AgRP, enquanto a outra expressa os neurotransmissores anorexigênicos α -MSH (clivado a partir de POMC) e CART (Flier, 2004). Neurônios α -MSH/CART do núcleo arqueado possuem conexões inibitórias curtas com os neurônios NPY/AgRP e conexões inibitórias longas com neurônios localizados no núcleo hipotalâmico lateral (LH), além de possuírem também conexões excitatórias longas com neurônios do núcleo paraventricular (PVN) (Schwartz, 2000). Na visão tradicional estes neurônios possuem apenas conexões inibitórias longas com o PVN e excitatórias longas com o LH (Schwartz et al., 2000). Porém, de acordo com a visão mais recente do sistema, acredita-se que além de possuírem conexões inibitórias longas com o PVN e excitatórias longas com o LH, os neurônios NPY/AgRP possuem também conexões inibitórias curtas com os α -MSH/CART (Xu et al., 2005). As

conexões de ambos os tipos de neurônios se fazem com duas subpopulações distintas tanto no PVN quanto no LH. No PVN existem neurônios que expressam os neurotransmissores CRH e TRH (Schwartz, 2000). Ambos com funções anorexigênicas, (Flier, 2004; Schwartz, 2000). Por outro lado, no LH também duas sub-populações distintas foram caracterizadas, uma delas expressando a orexina, com papel predominantemente orexigênico, e a outra expressando o MCH (Flier, 2004).

Num ambiente no qual predominam os baixos níveis de leptina e insulina, como por exemplo, durante o jejum prolongado e em indivíduos com baixo percentual de gordura corporal, a maior parte dos receptores Obr e IR no núcleo arqueado estão desocupados. Nesta situação predominam os sinais e conexões excitatórios para os neurônios NPY/AgRP e os sinais e conexões inibitórios para os α -MSH/CART (Flier, 2004). Como resultado, há aumento da expressão de orexina e MCH no LH acompanhado da redução da expressão de TRH e CRH no PVN (Schwartz et al; 2000). Por outro lado, após uma refeição, quando principalmente os níveis de insulina se elevam ou quando há discreto ganho de massa de tecido adiposo como, por exemplo, após um período de ingestão alimentar média aumentada, o que resulta na elevação dos níveis de leptina e insulina, existe uma redução da expressão de orexina e MCH no LH e aumento da expressão de TRH e CRH no PVN (Schwartz et al; 2000).

Acredita-se hoje que falhas em alguns dos componentes deste complexo sistema de controle da homeostase energética possam desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade. Os diversos modelos animais de obesidade causada por defeitos monogênicos espontâneos ou por recombinação gênica nos permitiram obter avanços consideráveis na compreensão do funcionamento deste sistema (Nandi, 2004). Entretanto, a procura por defeitos genéticos similares em pacientes obesos foi frustrante uma vez que, de acordo com dados epidemiológicos e genéticos atuais, a obesidade desenvolvida como consequência de defeitos monogênicos é relativamente rara em humanos (Nandi, 2004; Snyder et al., 2004).

Levando-se em consideração que o avanço epidêmico da obesidade em diversas regiões do planeta ocorre em íntima associação com a modificação do padrão alimentar e a introdução de hábitos de vida mais sedentários, é de se supor que, para a maior parte das

peessoas que se tornam obesas, fenômenos ambientais como a dieta inadequada e o sedentarismo devam se associar a fatores genéticos predisponentes (raramente monogênicos) para, finalmente, produzir o fenótipo de obesidade. Assim, uma das mais importantes questões atuais referentes à fisiopatologia da obesidade diz respeito aos mecanismos através dos quais os fenômenos ambientais interagem com fatores genéticos predisponentes para produzir o quadro clínico em questão.

A partir do momento em que se progrediu na caracterização da ação hipotalâmica da insulina tornou-se claro que, caso o fenômeno da resistência à insulina, tão conhecido em tecidos periféricos, ocorresse também no hipotálamo, uma das possíveis conseqüências de sua manifestação seria a redução da atividade anorexigênica exercida por este hormônio. Além disso, tendo em vista a ação modulatória positiva da insulina sobre a atividade hipotalâmica da leptina, seria pertinente acreditar que a própria função adipostática da leptina fosse comprometida. Assim, a procura por evidências experimentais e clínicas de que o fenômeno de resistência hipotalâmica à ação da insulina e da leptina pudesse existir e compor o quadro da obesidade, passou a ser o foco de interesse de vários grupos em atividade nesta área do conhecimento.

Como descrito anteriormente, insulina e leptina são hormônios que regulam a longo prazo o peso corporal através do cérebro. Ambos os hormônios atravessam a barreira hematoencefálica e, após ativação dos seus respectivos receptores, presentes no cérebro (hipotálamo), e de proteínas envolvidas na transmissão do sinal desses hormônios, respostas neuronais integradas são necessárias para modular a ingestão alimentar e gasto energético. Diversos mecanismos podem contribuir para a resistência central desses hormônios, alterando portanto esse balanço energético, levando a obesidade.

PTP1B como uma reguladora negativa da ação da leptina e insulina

O início, a propagação e o término dos eventos de sinalização que controlam diversos processos celulares são determinados pelo nível de fosforilação em tirosina de proteínas (Kennedy and Ramachandran, 2000). A proteína tirosina fosfatase-1B (PTP1B) é

membro da família das proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) e representa a forma citosólica da enzima (Ukkola and Santaniemi, 2002). PTP1B é amplamente expressa incluindo tecidos que são reguladores importantes do metabolismo da insulina como fígado, músculo e adiposo (Goldstein, 2002). Nesses tecidos a PTP1B é a principal PTP (Ukkola and Santaniemi, 2002). O envolvimento da PTP1B na sinalização da insulina tem sido sugerido em inúmeros relatos.

A maioria dessas evidências originou-se de fenótipos de camundongos “knockouts” da PTP1B (Asante-Appiah and Kennedy, 2003), a qual potencialmente pode atenuar a sinalização da insulina desfosforilando o receptor de insulina (IR), IRSs ou, possivelmente, outras moléculas fosfotirosil dependentes da sinalização da insulina, ainda não identificadas. O local da ação da PTP1B na via de sinalização da insulina ainda permanece desconhecida (Kennedy and Ramachandran, 2000). Análises com camundongos PTP1B^{-/-} mostram um aumento na sensibilidade a insulina e fosforilação em tirosina do IR, sugerindo que o receptor seja realmente um alvo fisiológico da PTP1B (Kennedy and Ramachandran, 2000; Asante-Appiah and Kennedy, 2003). Entretanto, essa questão ainda não está totalmente elucidada. O mecanismo pelo qual a PTP1B interage com o IR, e onde ela está posicionada na via de sinalização da insulina requer maiores investigações (Bandyopadhyay et al., 1997; Kennedy and Ramachandran, 2000).

A aplicação do oligonucleotídeo antisense para PTP1B (PTP1B-ASO) tem diminuído a expressão da PTP1B e adiposidade em camundongos ob/ob (Rondinone et al., 2002), em células FAO de hepatoma de rato (Clampit et al., 2003) e em fígado de camundongos ob/ob tratados com PTP1B-ASO (Gum et al., 2003). A inibição da PTP1B aumenta a fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2, e eficazmente reduz a hiperinsulinemia (Zinker et al., 2002).

Estudos em modelos animais e em células, mostram que a redução da atividade basal ou níveis da PTP1B alteram a sinalização de maneira positiva. Como observado na literatura, camundongos “knockouts” para PTP1B tem um aumento na sensibilidade a insulina, e resistência a diabetes (Cheng et al., 2002). Um dos mais surpreendentes fenótipos de camundongos deficientes da PTP1B é a sua resistência a obesidade induzida

pela dieta. Além da via de sinalização da insulina, a PTP1B está envolvida na regulação de diversas funções celulares, incluindo a via de sinalização da leptina.

Zabolotny et al., (2002) demonstraram que camundongos PTP1B^{-/-} são mais sensíveis à leptina, não apresentando elevação dos níveis de leptina quando tratados com dieta hiperlipídica. Na ausência de leptina a perda da PTP1B é capaz de atenuar o ganho de peso sem mudança significativa na ingestão alimentar. A administração de leptina exógena também revelou que, na deficiência da PTP1B, houve um aumento na sensibilidade à leptina (Cheng et al., 2002). Sugeriu-se que a Jak-2 é um substrato potencial da PTP-1B, regulando negativamente a via de sinalização da leptina via desfosforilação da Jak-2 (Cheng et al., 2002). Para entender melhor o mecanismo de ação da PTP1B sob adiposidade, produziram-se camundongos com deleções específicas da PTP1B no fígado, músculo, tecido adiposo e cérebro, mostrando que somente os camundongos com deleção neuronal da PTP1B são resistentes a obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica e são protegidos contra o desenvolvimento da resistência à leptina (Bence et al., 2006).

Embora estudos com animais “knockouts” tecido específicos para a proteína PTP1B mostrem alterações metabólicas e funcionais importantes, o conhecimento da função da PTP1B na regulação da sinalização da insulina e leptina no cérebro permanece ainda limitado, com questões importantes que precisam ser respondidas como: 1- a importância do local da populações de neurônios que expressam PTP1B e medeiam os efeitos do sistema nervoso da insulina e leptina; 2- se os níveis de leptina estão também elevados em outros modelos animais com diminuição seletiva da expressão da PTP1B em discretos núcleos hipotalâmicos, e 3- quais tecidos periféricos estão envolvidos na homeostase da glicose. O alvo deste presente estudo foi investigar estas questões específicas. Para responde-las, geramos uma redução seletiva e transiente da expressão da PTP1B através da infusão de um oligonucleotídeo antisense, para bloquear a expressão da PTP1B em áreas ao redor do terceiro ventrículo do hipotálamo.

OBJETIVOS

Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do tratamento icv de ratos Wistar machos submetidos a uma dieta hiperlipídica ou padrão com oligonucleotídeos antisense para a PTP1B sobre:

- A variação da adiposidade e a ingestão alimentar.
- A transdução do sinal da leptina e insulina através de proteínas iniciais da via de sinalização no hipotálamo.
- Captação de glicose, induzida pela insulina em fígado e músculo.
- Atividade, expressão, localização da PTP1B, atividade PTPase total e atividade PTPase associada ao IR e Jak-2 em hipotálamo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Anticorpos, reagentes químicos e materiais

Os anticorpos anti-IR, IRS-1, IRS-2, Obr, Jak-2, Stat3 e anti-fosfotirosina foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-PTP1B (AB-1 mouse polyclonal) foi adquirido da Calbiochem (La Jolla, CA). pp60^{src} C-terminal phosphoregulatory peptide (TSTEPQpYQPGENL); onde pY representa fosfotirosina e o reagente Biomol Green foram obtidos do Biomol (Plymouth Meeting, PA). Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (¹²⁵I) e [3-³H]glicose e 2-deoxi-D-[1-¹⁴C]glicose (2-[¹⁴C]DG1) foram adquiridos da Amersham (Amersham, UK), e a Proteína A Sepharose 6 MB da Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (Hybond *ECL*, 0.45 µm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). A insulina regular humana (Humulin R) foi adquirida da Lilly. Leptina foi adquirida da Calbiochem (San Diego, CA, USA). O agente anestésico tiopental sódico foi obtido da Cristália (Itapira/SP, Brasil). Cloridrato de cetamina foi obtida da Fort Dogde Laboratories Inc. (Fort Dodge, IA, USA). Oligonucleotídeos fosforotioados sense e antisense específicos, para PTP1B (sense, 5'- AAA GTG CTG TTG G -3' e antisense, 5'-CCA ACA GCA CTT T-3') foram produzidos pela Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Kits para a dosagem de insulina e leptina foram obtidos da Amersham Biosciences, (Biotrak, Aylesbury, UK).

Animais e procedimentos cirúrgicos

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar de quatro semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: ratos-controle (C), alimentados com dieta-padrão: (carboidrato: 70%; proteína: 20%; lipídeos: 10%, totalizando: 3.8 kcal/g) e ratos com obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica (DIO): (carboidrato: 38.5%; proteína: 15%; lipídeos: 46.5%, totalizando: 5.4 kcal/g) durante dois meses.

Os ratos foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (0.8 mL) e diazepam (0.2 mL). Após a ausência dos reflexos corneal e podal, os ratos foram posicionados no aparelho de estereotaxia para implantação de uma cânula no terceiro ventrículo do hipotálamo, seguindo as coordenadas do Atlas Paxinos-Watson (Paxinos et al, 1980). Ao final da cirurgia, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), em ciclo de 12 horas-luz e 12 horas de escuro por uma semana para recuperação da cirurgia estereotáxica. A seguir os animais foram submetidos a um teste de resposta de ingestão hídrica com a infusão de angiotensina II (2.0 μL a 10^{-6} M). Para a avaliação da posição correta da cânula (Johnson and Epstein, 1975).

Tratamento com o oligonucleotídeo

Foram utilizados para os experimentos as sequências do oligonucleotídeo sense e antisense, específica para PTP1B (sense, 5'-AAA GTG CTG TTG G -3' e antisense, 5'- CCA ACA GCA CTT T -3'). Os oligonucleotídeos foram construídos a partir da sequência de RNAm de PTP1B (*Rattus norvegicus*), obtida do “GeneBank”. Compatibilidade entre a sequência de RNAm de PTP1B de rato foi verificada através do programa “Blast, PubMed” (www.ncbi.nlm.nih.gov). A habilidade para bloquear a expressão da PTP1B foi avaliada através de “immunoblotting”, usando anticorpo específico para PTP1B.

Ratos controle e DIO foram canulados e mantidos em gaiolas individuais para o tratamento com oligonucleotídeo sense para PTP1B (PTP1B-Sense) ou oligonucleotídeo antisense para PTP1B (PTP1B-ASO). Oligonucleotídeos sense e antisense para PTP1B foram diluídos em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) e o tratamento foi realizado através de infusões icv duas vezes ao dia (8:00h/18:00h) com um volume total de 2.0 μl por dose (4.0 nmol/ μl) por 4 dias.

Determinação da massa de tecido epididimal e retroperitoneal

Após quatro dias de tratamento icv com PTP1B-ASO ou PTP1B-Sense, os ratos foram anestesiados, a cavidade abdominal foi aberta e toda a massa de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, dissecada e pesada.

Determinação das concentrações de insulina e leptina

Após o tratamento descrito acima, os ratos foram mantidos em jejum por 12h. Amostras de sangue (0.5 ml) foram coletadas da cauda para determinar as concentrações de insulina e leptina no plasma, medidas por radioimunoensaio.

Avaliação da ingestão alimentar

Os animais (controle e DIO), foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e tratados intracerebroventricular (icv) com PTP1B-ASO ou PTP-1B-Sense 2 vezes ao dia durante quatro dias. Durante esse período os animais foram privados de alimento por 6h (das 12 às 18 h) e a ingestão alimentar foi avaliada após as próximas 12 horas. Ao final do quarto dia (18 h) os animais receberam infusões icv com insulina (2.0 μ l, 10^{-6} M), leptina (2.0 μ l, 10^{-6} M) ou salina (2.0 μ l) e a ingestão alimentar foi determinada após as próximas 12 horas através da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola.

Dissecção do hipotálamo

Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneal foram utilizados como controle da anestesia. Os animais receberam infusão icv de insulina (2.0 μ l, 10^{-6} M), leptina (2.0 μ l, 10^{-6} M) ou salina (2.0 μ l) e após 15 min o crânio foi aberto, o hipotálamo retirado e

em seguida homogeneizado em tampão de extração (1% Triton X-100; 100mM Tris pH 7,4; contendo 100mM de pirofosfato de sódio; 100mM de fluoreto de sódio; 10mM de vanadato de sódio; 2mM PMSF e 0,1 mg de aprotinina/mL) a 4°C em “Politron PTA 20S generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. O tecido homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 30 minutos para remoção de material insolúvel. A proteína total contida no sobrenadante foi determinada utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976).

Imunoprecipitação

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, parte do sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação “overnight”, a 4°C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado após a incubação com proteína A Sepharose 6MB por 2 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas (20 minutos a 4°C, 11000 rpm), e o precipitado lavado três vezes, em intervalos de cinco minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100), sendo o sobrenadante descartado após última lavagem.

Immunoblotting

Os imunocomplexos (1 mg) e os extratos totais (0,2 mg) de proteína foram ressuspensos em tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), contendo 100 mmol/l de DTT. Após rápida fervura (cinco minutos) foram aplicados em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada “overnight” com anticorpos específicos. A ligação do anticorpo a proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10mmol/l de Tris, 150 mmol/l de NaCl, 0,02% de Tween 20) por 1,5 hora. O complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida através do tratamento com 2 μ Ci de [¹²⁵I]

Proteína A ($30\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) em 10 mL de tampão de bloqueio por duas horas em temperatura ambiente e exposição a filmes de RX Kodak a 80°C de 12-48 horas. As bandas identificadas na auto-radiografia foram quantificadas através de densitometria óptica.

Imunoistoquímica

Ratos foram anestesiados e, após a perda dos reflexos podal e corneal, realizou-se toracotomia mediana com posterior canulação transcardíaca da aorta torácica. Os animais foram, então, perfundidos com cerca de 80 ml de solução fisiológica heparinizada (0,01% volume/volume) e, a seguir 80 ml de paraformaldeído (Sigma) a 4%, dissolvido em água destilada pré-aquecida e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. Ambas as perfusões foram feitas com bomba de infusão, numa velocidade fixa de 4 ml/min. A seguir, foi realizada craniotomia e o hipotálamo foi cuidadosamente retirado. O hipotálamo foi então banhado em álcool em diferentes concentrações (70%,80%,95% e 100%), xilol, e xilol/parafina. A seguir, o órgão foi incluído em bloco de parafina, onde foi seccionado em cortes de 5 μm e fixados em lâminas de microscopia previamente sinalizadas. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes), as lâminas foram desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool e lavadas cerca de três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4.

A seguir, foi iniciada a reação de imunofluorescência na qual, os cortes foram tratados com Triton X-100 por 10 min e novamente lavados três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4. A seguir, bloqueados com leite desnatado 5%, diluídos em PBS 0,1 M, pH 7,4 por 1 hora. Os cortes foram incubados com anticorpo primário específico para PTP1B em BSA 1% e PBS 0,1 M, pH 7,4, na diluição de 1/50 overnight, a 4°C . A seguir foram lavados três vezes como descrito anteriormente e novamente incubados, usando agora o anticorpo secundário conjugado com FITC (Sigma) em leite desnatado 1% e PBS 0,1 M, pH 7,4, na diluição de 1/500, durante 2 horas e analisados em microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Laser Scanning Confocal Microscope), de acordo com a técnica previamente descrita (Torsoni et al., 2003).

Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico

Após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg) e diazepam (0.07 mg) (0.2 ml/100 g peso) e em condições assépticas, foi inserido um cateter de polietileno na artéria carótida para a coleta de amostras sanguíneas e um segundo cateter na veia jugular para a administração de insulina e glicose. Os animais foram mantidos aquecidos a 37°C durante todo o estudo. Durante a primeira fase do estudo (30 min), a quantidade de insulina infundida foi aquela necessária para alcançar um platô de glicose. Após ter sido mantido o equilíbrio da glicemia, a infusão de insulina (3.6 mU/kg/min) foi mantida numa constante (0,20 ml/h) durante duas horas e a infusão de glicose (solução de 5%) foi ajustada para manter a concentração plasmática de glicose próxima a 120 mg/dl. Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular a cada cinco minutos para a determinação da glicemia (Prada et al., 2005).

O fluxo de glicose estimulado pela insulina foi estimado através de uma infusão contínua inicial de HPLC-purificada [3-³H]glicose (10 µCi bolus, 0.1 µCi/min). Para estimar o transporte de glicose estimulado pela insulina no músculo esquelético, foi administrado (10 µCi) de 2-[¹⁴C]DG1 45 min antes do final do procedimento do clamp. Amostras de sangue (20 µl) foram coletadas em 80, 90, 100, 110, e 120 min após o início do procedimento do clamp para determinar as concentrações plasmáticas da [³H]glicose e 2-[¹⁴C]DG1. Ao final do procedimento de clamp, os animais foram sacrificados usando uma mistura de cloridrato de Cetamina e Diazepam intravenosamente (Prada et al., 2005). Após dois min foram retirados fragmentos de músculos esqueléticos (soleo e gastrocnêmio) e fígado. Os fragmentos dos tecidos foram colocados em “NCS-II Tissue Solubilizer” (Amersham, Bucks, England), para posterior solubilização. Então o sobrenadante foi medido, usando-se líquido de cintilação (ACS-II Amersham - Japão, Tóquio) e o equipamento (Aloka, Model LSC -1000, Kioto), para verificar a radioatividade resultante do ³H e do ¹⁴C (Araújo et al., 2005).

Ensaio da Atividade proteína tirosina fosfatase 1B

O ensaio da atividade PTP1B *in vitro* foi baseado no protocolo previamente descrito por Taghibiglou et al., 2002. O hipotálamo foi removido e homogeneizado em solução tampão contendo 1% Triton X-100, 20 mM, Tris (pH 7.6), 5 mM EDTA, 2 mM PMSF e 0.1 mg aprotinina/mL, 1mM EGTA e 130mM NaCl. A amostra foi centrifugada (15.000 rpm, 40 min, 4°C) e o sobrenadante coletado para a imunoprecipitação com anticorpos anti-IR, anti-Jak-2 e anti-PTP1B, como descrito anteriormente. Imunoprecipitados foram lavados três vezes por cinco minutos com tampão de ensaio (100mM HEPES (pH 7.6), 2 mM EDTA, 1mM ditioneitol, 150mM NaCl, 0,5mg/mL de albumina sérica bovina). O peptídeo fosforegulatório pp60^{c-src} C-terminal (TSTEPQpYQPGENL; Biomol) foi adicionado a uma concentração final de 200µM, em um volume total de reação de 60µL, em tampão de ensaio. A atividade PTPase do extrato total (125µg) foi medida da mesma maneira num volume total de reação de 60µL, adicionando o peptídeo numa concentração final de 200µM. A reação foi seguida por uma hora a 30°C. Ao final da reação, alíquotas de 40µL foram colocadas em placas de 96 poços e adicionado 100µL do reagente Biomol Green (Biomol), e a absorbância foi medida a 660nm em ELISA.

Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± SEM seguido do número indicado dos experimentos. Para as análises estatísticas, os grupos foram comparados usando two-way ANOVA seguida por análise de significância Bonferroni. O nível de significância adotado foi $P < 0.05$.

RESULTADOS



Expressão e localização da PTP1B em hipotálamo de ratos após o tratamento com oligonucleotídeo antisense PTP1B

O oligonucleotídeo antisense PTP1B (PTP1B-ASO) e oligonucleotídeo sense PTP1B (PTP1B-Sense) foram administrados através de infusões no terceiro ventrículo de ratos controle e com obesidade induzida pela dieta (DIO). A redução da expressão da PTP1B foi avaliada através das técnicas de “immunoblotting”. Cortes histológicos do hipotálamo foram submetidos à técnica de imunistoquímica como descrita em materiais e métodos para avaliação da localização da PTP1B. A eficácia do PTP1B-ASO foi analisada através de experimentos dose-resposta. Duas doses diárias de 4 nmol foram suficientes para inibir a expressão da PTP1B em 70% em ratos-controle. (Fig.1A). Os níveis hipotalâmicos da PTP1B estavam aumentados em ratos DIO comparado com ratos-controle, havendo uma diminuição significativa após o tratamento com PTP1B-ASO (Fig.1A). Essa seletiva inibição da PTP1B em hipotálamo foi confirmada através da imunistoquímica. Reduções substanciais da expressão foram observadas no núcleo arqueado e lateral do hipotálamo (Fig. 1B). Não houve mudanças em outras regiões do cérebro. Além disso, os efeitos do tratamento com PTP1B-ASO se restringiu apenas à área hipotalâmica, não havendo redução no músculo esquelético, fígado e adiposo (dados não mostrados).

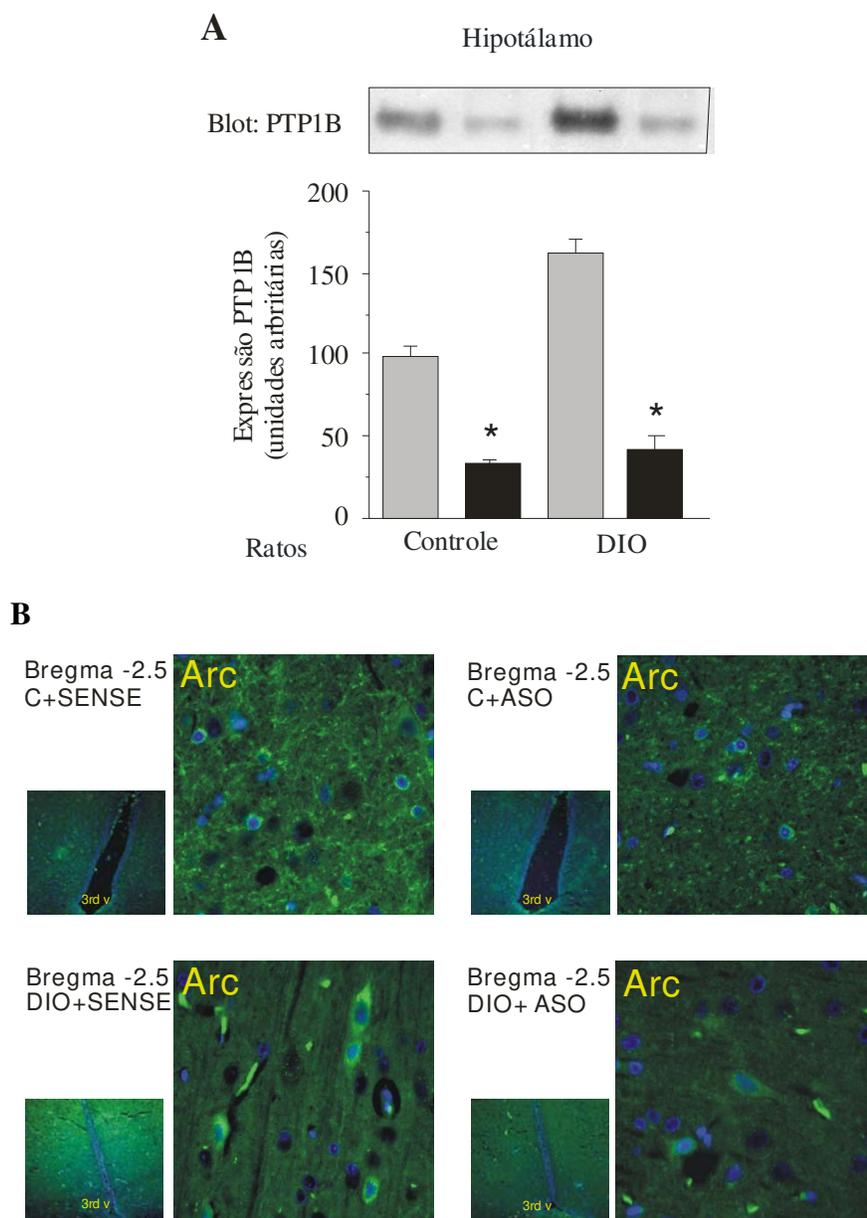


Fig. 1- Avaliação da expressão e localização da PTP1B em hipotálamo de ratos após o tratamento com oligonucleotídeo antisense PTP1B. Ratos-controle e DIO foram tratados duas vezes ao dia durante quatro dias com PTP1B-ASO ou PTP1B-Sense e em seguida os hipotálamos foram extraídos e homogenizados. Os extratos protéicos foram submetidos à “immunoblotting” com anticorpo anti-PTP1B (A). Cortes histológicos de hipotálamos perfundidos com paraformaldeído foram submetidos à caracterização histológica de distribuição de proteína pelo método de imunistoquímica, utilizando-se anticorpo específico para PTP1B (B) As imagens são representativas de três experimentos independentes. As bandas foram densitometricamente quantificadas pelo programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes. *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO ■ vs PTP1B-Sense □.

Características metabólicas

Ao final de quatro dias de tratamento com PTP1B-ASO ou PTP1B-Sense, avaliamos o efeito *in vivo* da redução hipotalâmica da PTP1B sob ingestão alimentar, peso corporal, gordura epididimal e retroperitoneal e níveis plasmáticos de leptina e insulina. Em ratos- controle e DIO tratados com PTP1B-ASO houve reduções de 50% e 70% da ingestão alimentar, respectivamente (Fig.2A). Essas reduções na ingestão alimentar foram acompanhadas de um decréscimo moderado no peso corporal de ratos controle e um significativo decréscimo em ratos DIO, após quatro dias de tratamento (Fig. 2B). Observamos também que ratos controle e DIO têm redução moderada na adiposidade após o tratamento com PTP1B-ASO (Fig. 2C). O tratamento com PTP1B-ASO produziu uma diminuição significativa das concentrações de leptina e insulina em jejum em ratos controle e DIO tratados com PTP1B-ASO, comparado com ratos controle e DIO tratados com PTP1B-Sense, respectivamente (Fig.2 D and E).

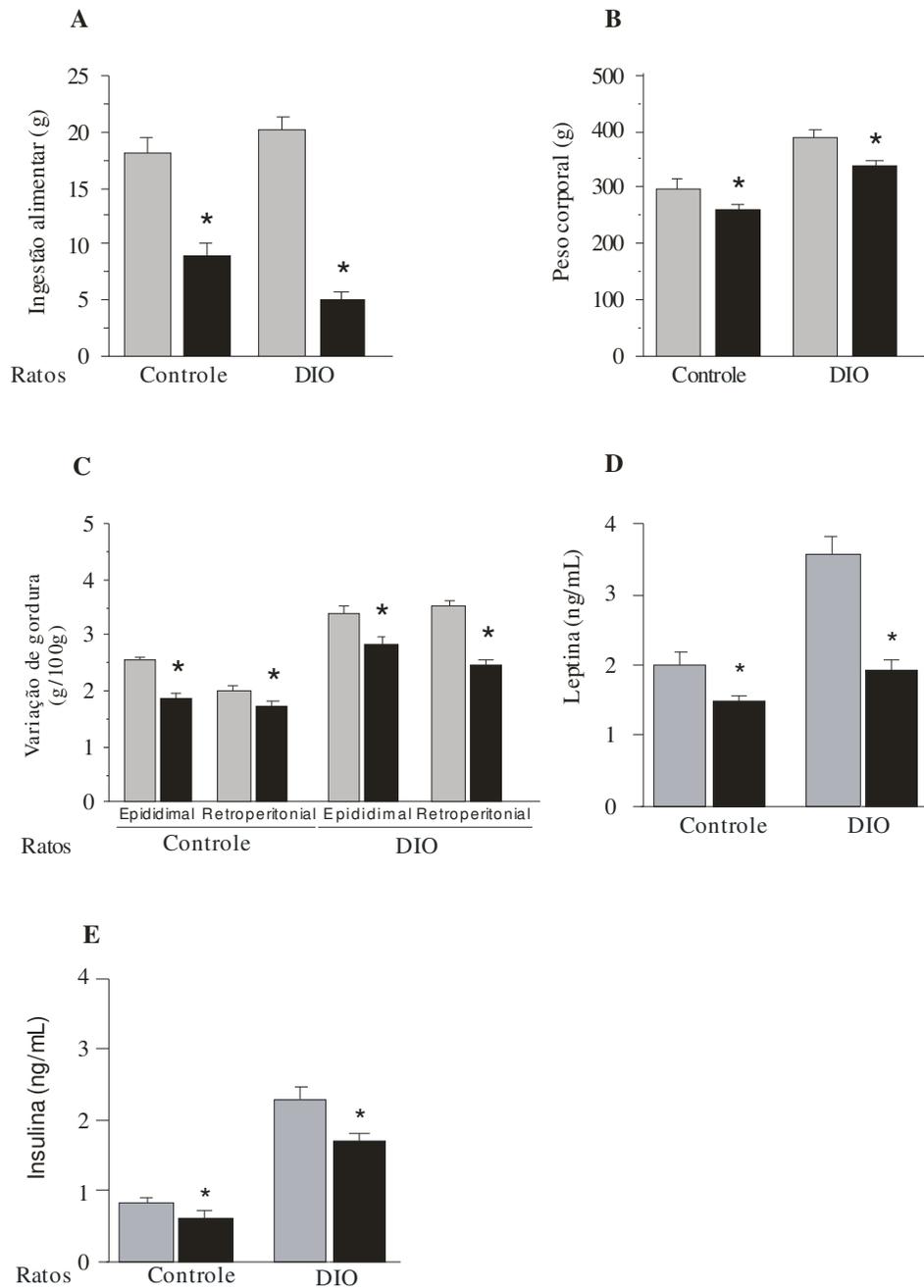


Fig. 2- Efeito da redução hipotalâmica da PTP1B sob parâmetros metabólicos. Ratos controle e DIO foram tratados duas vezes ao dia durante quatro dias com PTP1B ASO ou PTP1B Sense e em seguida os parâmetros metabólicos foram avaliados. Ingestão alimentar (**A**), Peso corporal (**B**), Massa de tecido adiposa epididimal e retroperitoneal (**C**), níveis de leptina (**D**), Níveis de insulina (**E**). Os dados são apresentados como média \pm SEM. Cada grupo foi composto de 15 animais. DIO or Control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO vs PTP1B-Sense.

Efeito da redução da PTP1B sob sinalização e saciedade induzida pela leptina em hipotálamo de ratos

Leptina provê um sinal anorexigênico robusto no hipotálamo. Para avaliar o efeito da redução hipotalâmica sob a ação da leptina no hipotálamo, ratos controle e DIO, ao final de quatro dias de tratamento com PTP1B-ASO ou PTP1B-Sense, foram cuidadosamente tratados com salina (2 μ l), ou leptina (2 μ l, 10^{-6} M) icv, e a ingestão alimentar foi medida após 12 horas. A infusão de leptina reduziu a ingestão alimentar em 42% e 19% em ratos- controle e DIO tratados com PTP1B-Sense, respectivamente (Fig. 3A).

A redução hipotalâmica da PTP1B suprimiu significativamente a ingestão alimentar induzida pela leptina em 60% e 85%, para ratos-controle e DIO tratados com PTP1B-ASO. Desse modo, a redução hipotalâmica da PTP1B leva a uma melhora significativa do efeito anorexigênico induzido pela leptina, o qual é mais evidente em ratos- DIO.

Em condições basais, a fosforilação em tirosina aumentou no hipotálamo de ratos controle tratados com PTP1B-ASO. Nesses animais, houve também um grande aumento na fosforilação em tirosina 15 min após a infusão icv de leptina, o qual se manteve até 60 min. Em condições basais e após estímulo com leptina, a fosforilação da Jak-2 estava reduzida em rato-DIO quando comparado com rato-controle (Fig. 3B). Ratos DIO demonstraram aumento na associação basal e após o estímulo com leptina entre Jak-2/PTP1B (Fig. 3C). Como esperado, o tratamento com PTP1B-ASO reduziu a associação entre Jak-2/PTP1B em ratos-controle e DIO. Ratos-controle ou DIO tratados com PTP1B-ASO apresentaram um aumento na fosforilação basal e após o estímulo com leptina, o qual se manteve por 60 min. Em ratos-controle tratados com PTP1B-ASO, houve também um aumento da fosforilação em tirosina do Obr no estado basal. Nesses animais, um grande aumento na fosforilação em tirosina do Obr foi também observado 15 min após a infusão icv de leptina, o qual foi mantida até 60 min. Em ratos-DIO comparados com ratos-controle, houve uma redução na fosforilação do Obr em condições basais e após o estímulo com leptina. O tratamento com PTP1B-ASO aumentou a fosforilação do Obr em condições basais e após o estímulo com leptina em ratos-DIO, o qual se manteve por

60 min após infusão com leptina (Fig. 3D). Em condições basais, a fosforilação em tirosina do Stat3 aumentou em hipotálamo de ratos-controle tratados com PTP1B-ASO. Nesses animais houve também um grande aumento na fosforilação em tirosina do Stat3 15 min após a infusão icv com leptina, mantido por 60 min. No estado basal e após o estímulo com leptina, a fosforilação do Stat3 foi reduzida em ratos-DIO quando comparado com os ratos controle. Ratos-DIO, tratados com PTP1B-ASO, exibiram um aumento na fosforilação do Stat3 em condições basais e após o estímulo com leptina, e esse foi mantido até 60 min após a infusão com leptina (Fig. 3E).

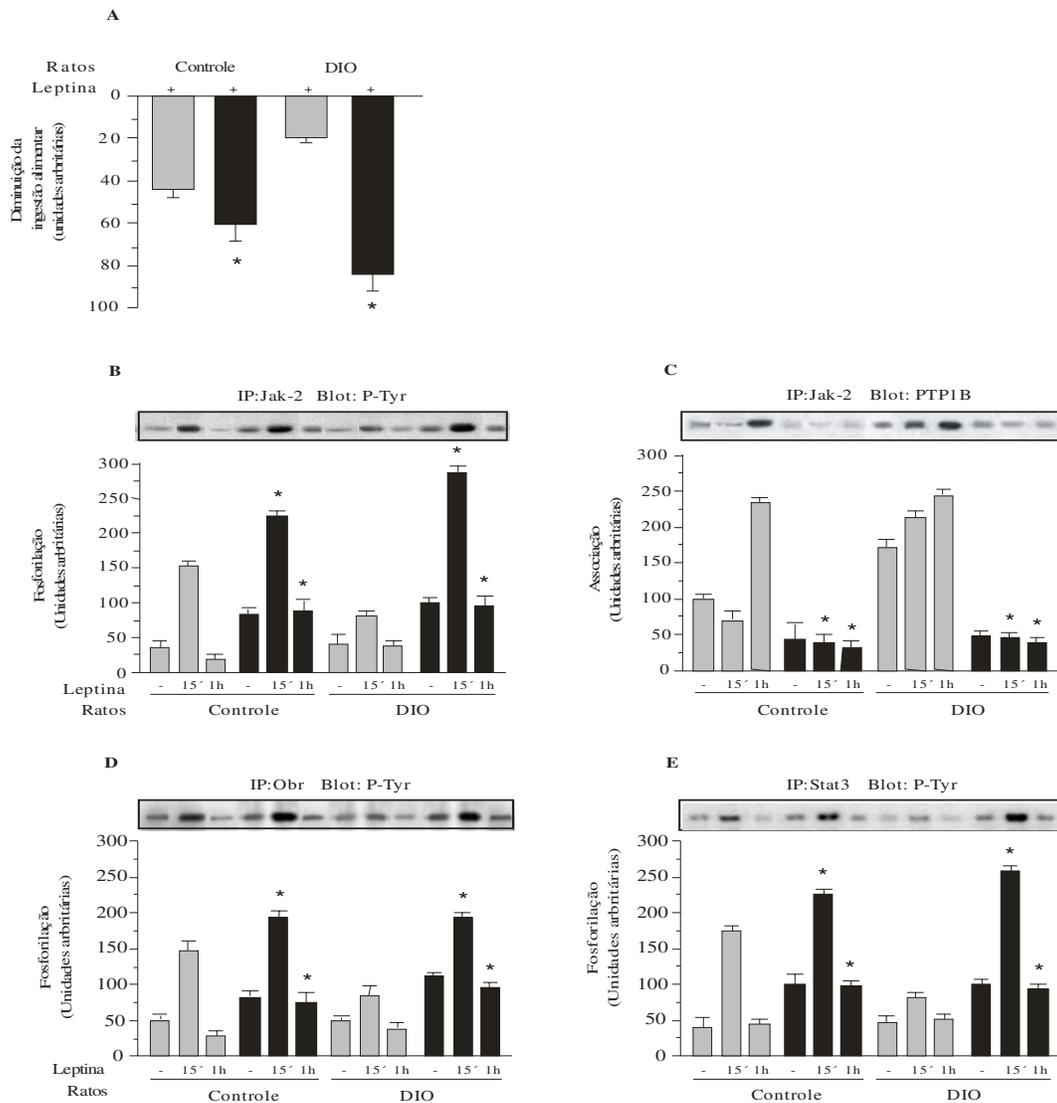


Fig. 3- Avaliação da redução da PTP1B sob a saciedade e sinalização da leptina. Ratos- controle e DIO foram tratados icv com PTP1B-Sense ou PTP1B-ASO por quatro dias duas vezes ao dia. A ingestão alimentar de ratos tratados com PTP1B-Sense ou PTP1B-ASO foi medida diariamente. Ao final do quarto dia de tratamento os ratos receberam infusão icv de salina (2.0 μ l) ou leptina (2.0 μ l, 10^{-6} M) e após 12 horas a ingestão alimentar foi medida (A). Para a avaliação da sinalização os ratos tratados com PTP1B-Sense ou PTP1B-ASO, foram anestesiados e receberam na manhã do quinto dia infusão icv de salina (2.0 μ l) ou leptina (2.0 μ l, 10^{-6} M), 15 min e 60 min após a infusão os hipotálamos foram extraídos e homogenizados. Os extratos protéicos foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos anti-Obr, anti-Jak-2 e anti-Stat3 e à “immunoblotting” com anticorpo anti- fosfotirosina (anti pY) (B, D e E) ou anticorpo anti-PTP1B (C). As bandas foram densitometricamente quantificadas pelo programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média \pm SEM de 4 experimentos independentes. Ratos-DIO ou controle: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO (15' e 60') vs PTP1B-Sense (15' e 60').

Efeito da redução da PTP1B sob sinalização e saciedade induzida pela insulina em hipotálamo de ratos

Para avaliar o efeito da redução hipotalâmica da PTP1B sob a ação da insulina no hipotálamo de ratos controle e DIO, ao final de quatro dias de tratamento com PTP1B-ASO ou PTP1B-Sense, os animais foram cuidadosamente tratados com salina (2 μ l) ou insulina (2 μ l, 10^{-6} M) icv, e a ingestão alimentar medida por 12 horas. A infusão de insulina reduziu de 32% e 23% na ingestão alimentar em ratos-controle e DIO tratados com PTP1B-Sense, respectivamente (Fig. 4A). A redução hipotalâmica da PTP1B significativamente a ingestão alimentar induzida pela insulina em 78% e 95%, em ratos-controle e DIO tratados com PTP1B-ASO. Desse modo, a redução hipotalâmica da PTP1B leva a uma melhora significativa do efeito anorexigênico induzido pela insulina.

Após o tratamento com PTP1B-ASO, houve um aumento na fosforilação em tirosina do IR em condições basais, 15 min e 60 min após a infusão icv de insulina em ratos controle. Em ratos-DIO a fosforilação do IR em condições basais e após o estímulo com insulina, estavam reduzidas quando comparado com os ratos-controle (Fig. 4B). Ratos-DIO exibiram um aumento na associação entre IR/PTP1B em condições basais e após o estímulo com insulina (Fig. 4C). Como esperado, o tratamento com PTP1B-ASO reduziu a associação entre IR/PTP1B em ratos-controle e DIO. Ratos-DIO tratados com PTP1B-ASO apresentaram um aumento na fosforilação em tirosina do IR em condições basais e após 15 min do estímulo com insulina, o qual se manteve por até 60 min. A redução da fosforilação do IRS-1 e IRS-2 em condições basais e após o estímulo com insulina foi observada em ratos-DIO comparado com os controle. Em ratos-DIO, tratados com PTP1B-ASO, houve um aumento na fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-2 sob condições basais e também 15 min após a infusão icv da insulina, o qual se manteve por 60 min. Resultados similares foram observados em ratos-controle após o tratamento com PTP1B-ASO (Fig.4 D e E).

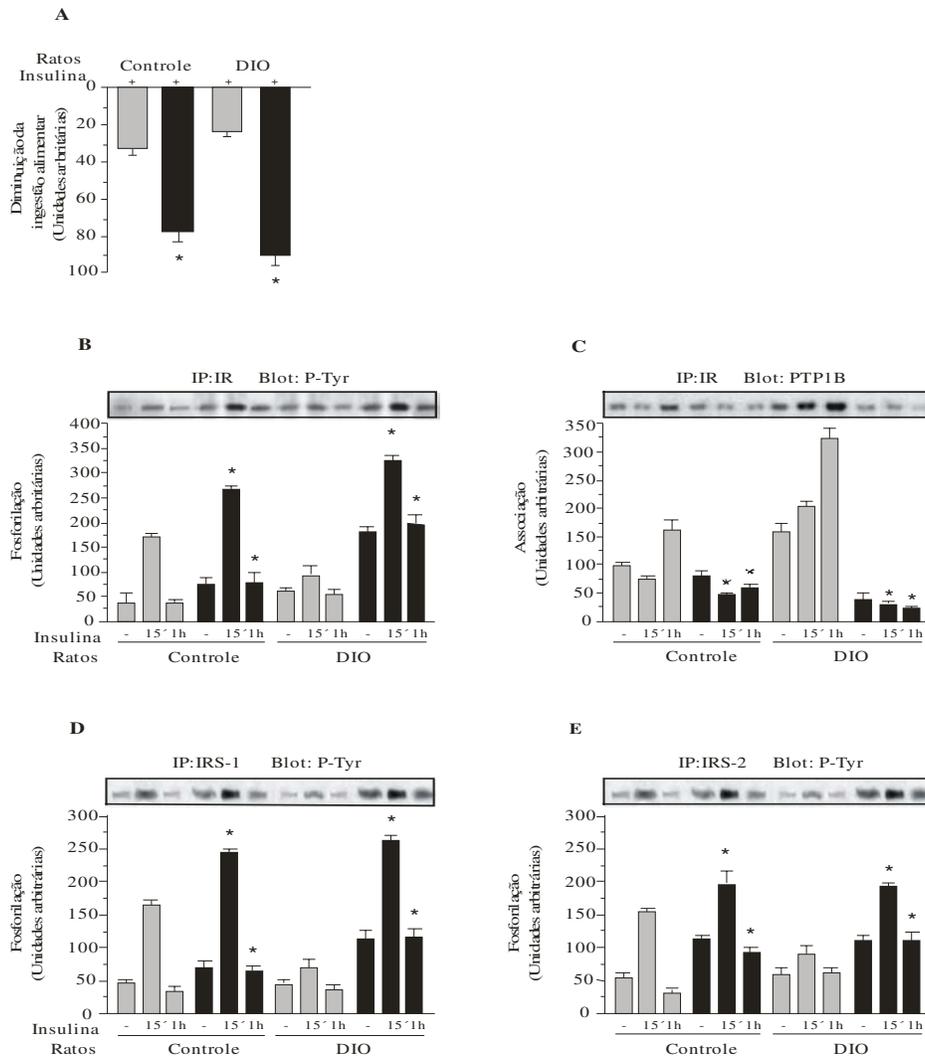


Fig. 4- Avaliação da redução da PTP1B sob a sinalização e saciedade induzida pela insulina.

Ratos-controle e DIO foram tratados icv com PTP1B Sense ou PTP1B-ASO por quatro dias duas vezes ao dia. A ingestão alimentar de ratos tratados com PTP1B Sense ou PTP1B-ASO foi medida diariamente. Ao final do quarto dia de tratamento os ratos receberam infusão icv de salina (2.0 µl) ou insulina (2.0 µl, 10⁻⁶ M) e após 12h a ingestão alimentar foi medida (A). Para a avaliação da sinalização os ratos tratados com PTP1B-Sense ou PTP1B-ASO, foram anestesiados e receberam na manhã do quinto dia infusão icv de salina (2.0 µl) ou insulina (2.0 µl, 10⁻⁶ M), e 15 min e 60 min após a infusão os hipotálamos foram extraídos e homogenizados. Os extratos protéicos foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos anti-IR, anti-IRS-1 ou anti-IRS-2 e à immunoblotting com anticorpo anti fosfotirosina (anti-pY) (B, D e E) ou anticorpo anti-PTP1B (C). As bandas foram densitometricamente quantificadas pelo programa ScionCorp. Os dados são apresentados como média ± SEM de 4 experimentos independentes. Ratos-DIO ou controle: *, P < 0.05 PTP1B-ASO (15' e 60') vs PTP1B-Sense (15' e 60').

Efeito da redução da PTP1B sobre o metabolismo de glicose

Para entendermos melhor a utilização da glicose em ratos-controle e DIO, tratados icv com PTP1B-ASO e PTP1B-Sense, realizamos o “clamp” hiperinsulinêmico euglicêmico nesses animais.

O procedimento foi realizado com infusões de glicose marcada radioativamente, como descrito nos Materiais e Métodos, para examinar os efeitos da redução da PTP1B em hipotálamo sobre o metabolismo de glicose no fígado e tecido muscular esquelético. A taxa de infusão necessária para manter a euglicemia de jejum na presença de infusão constante de insulina (3.6 mU/Kg peso/min) foi maior em ratos-controle tratados com PTP1B-ASO, comparado com ratos-controle tratados com PTP1B-Sense (Fig. 5A). Houve uma redução significativa na taxa de infusão de glicose em ratos-DIO, a qual foi revertida quando os animais foram tratados com PTP1B-ASO. A captação de glicose estimulada pela insulina foi quantificada através da captação de 2DG em tecido muscular esquelético. A captação de glicose no músculo esquelético foi significativamente reduzida em ratos DIO tratados com PTP1B-Sense, e essa alteração foi completamente revertida em ratos DIO tratados com PTP-1B-ASO (Fig. 5B). A Fig. 5C demonstra que a diminuição da produção hepática de glicose (HGO), estimulada pela insulina, foi bloqueada em ratos-DIO tratados com PTP1B-Sense, mas quando esses animais foram tratados com PTP1B-ASO o efeito da insulina foi completamente revertido.

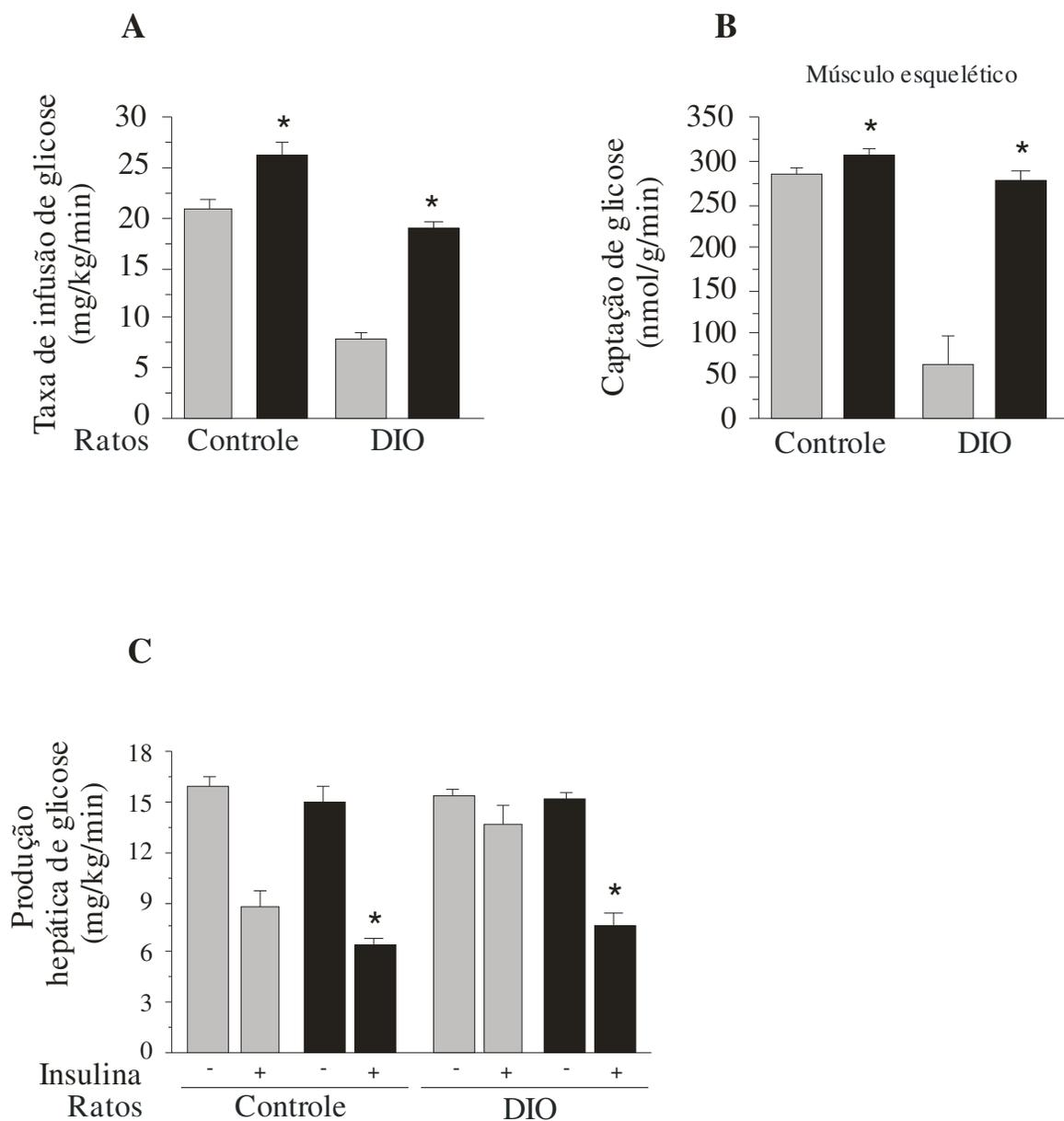


Fig. 5- Avaliação do efeito da redução hipotalâmica da PTP1B sob o metabolismo de glicose. Ratos-DIO e controle tratados icv com PTP1B-Sense ou PTP1B-ASO por quatro dias duas vezes ao dia foram anestesiados e submetidos ao “clamp” hiperinsulinêmico euglicêmico como descrito em materiais e métodos. A taxa de infusão de glicose (A); O transporte de glicose no tecido muscular esquelético foi avaliado através da captação da 2DG (B); Produção hepática de glicose em condições basais e após o estímulo com insulina (C). Os dados são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes. Ratos DIO ou controle: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO (■) (+) vs PTP1B-Sense (□) (+).

Atividade proteína tirosina fosfatase e PTP1B

O aumento da atividade PTPase nos estados de resistência à insulina está correlacionado com o aumento da expressão da PTP1B (Kennedy, 1999). Observamos em nossos resultados, um aumento na atividade PTPase hipotalâmica em ratos-DIO, comparado com ratos-controle. Após o tratamento com PTP1B-ASO, a atividade PTPase diminuiu em ratos-controle e ratos-DIO (Fig. 6A). Para investigar especificamente a atividade PTP1B, medimos a atividade dessa enzima no imunoprecipitado da PTP1B. Os resultados demonstraram que a atividade da PTP-1B está aumentada em hipotálamo de ratos-DIO, comparado com os animais-controle. Após o tratamento com PTP1B-ASO, a redução na atividade PTP1B foi observada em ratos-controle e DIO (Fig. 6B).

Alem da atividade PTPase total, medimos a atividade PTPase nos imunoprecipitados com IR e Jak-2 e encontramos um aumento na atividade PTPase associada a essas proteínas em ratos-DIO, comparada com ratos-controle, respectivamente (Fig. 6C and D). Após o tratamento com PTP1B-ASO, houve uma diminuição na atividade PTPase associada ao IR e Jak-2 em ratos-controle e DIO.

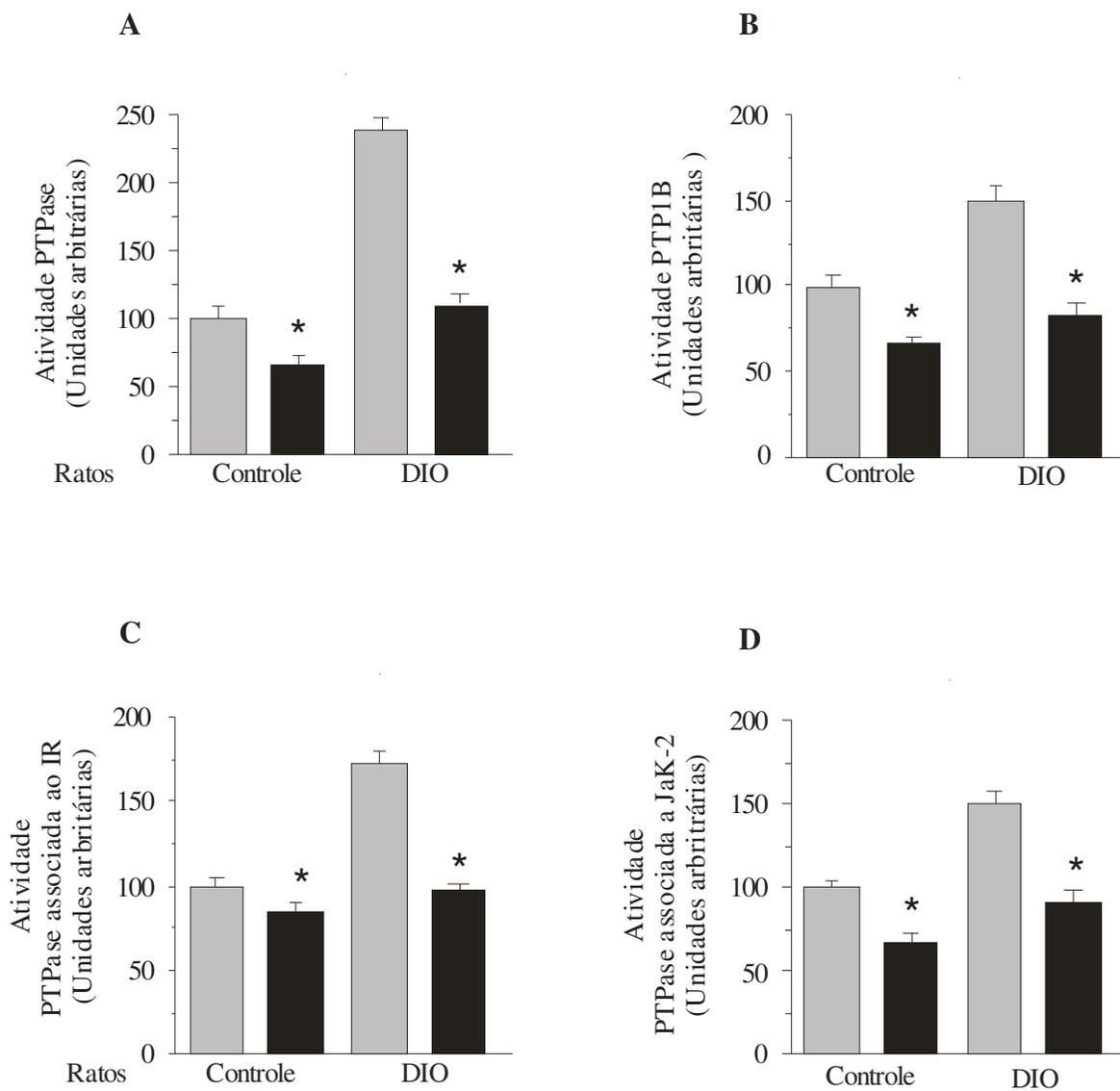


Fig.6- Avaliação da redução da PTP1B sob a atividade PTPase e PTP1B. Ratos- controle e DIO foram tratados icv com PTP1B Sense ou PTP1B-ASO por quatro dias duas vezes ao dia. Os ratos foram anestesiados, os hipotálamos foram extraídos e homogeneizados. Parte dos extratos protéicos foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos anti-IR, anti-Jak-2 ou anti-PTP1B. O extrato total e os imunoprecipitados foram incubados com peptídeo fosforegulatório pp60^{C-src} C-terminal (TSTEPQpYQPGENL), como descrito nos materiais e métodos para avaliação da atividade PTPase total (A), atividade PTP1B (B) e atividade PTPase associada ao IR (C) e Jak-2 (D). Os dados são apresentados como média \pm SEM de 4 experimentos independentes. Ratos DIO ou controle: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO vs PTP1B-Sense .

DISCUSSÃO

A resistência à leptina e insulina é provavelmente o fator central no desenvolvimento da obesidade. No entanto, o mecanismo molecular ainda é pouco entendido. A ligação da leptina ou da insulina aos seus respectivos receptores ativa uma série de eventos intracelulares que culminam com o controle da expressão gênica, regulação da atividade de canais iônicos, atividade elétrica de neurônios e controle da produção e liberação de neurotransmissores, entre outros, como descrito anteriormente. Nos últimos anos, diversos grupos têm procurado caracterizar os defeitos da transdução do sinal destes hormônios no hipotálamo e relacioná-los a defeitos no controle dos eventos fisiológicos controlados pelos mesmos, como por exemplo, a fome.

Um dos mecanismos potencialmente envolvidos no desenvolvimento da resistência à ação de hormônios adipostáticos (leptina e insulina), está relacionado à atividade da proteína tirosina fosfatase PTP1B. Durante os últimos anos evidências genéticas e bioquímicas tem revelado uma função importante para PTP1B como reguladora negativa das ações metabólicas induzidas pela leptina e insulina (Johnson et al., 2002). A maior evidência que a PTP1B está envolvida na via de sinalização da insulina originou-se do fenótipo de camundongos “knockout” e de resultados com tratamento com PTP1B-ASO em roedores diabéticos (Asante-Appiah e Kennedy, 2003). Outros estudos com camundongos “knockout” também demonstraram que a PTP1B é uma reguladora da sinalização da leptina através do decréscimo da proporção leptina/gordura corporal, hipersensibilidade à leptina e aumento da fosforilação do Stat3 induzida pela leptina. Diversos estudos têm avaliado a expressão da PTP1B em roedores e humanos com resistência à insulina, diabetes e obesidade. Muitos relatos mostram um aumento na expressão e atividade da PTP1B em roedores e humanos nesses estados (Ahmad and Goldstein, 1995; Dadke, 2000., Venable et al., 2000., Ropelle et al., 2006).

Pouco se sabe sobre o mecanismo da ação da PTP1B na sinalização da insulina e leptina em hipotálamo de ratos. A PTP1B é expressa em regiões hipotalâmicas importantes para a regulação da massa corporal, entre elas o núcleo arqueado (Zabolotny et al., 2002), onde há grande expressão de receptores de leptina e insulina (Schwartz et al., 2000). Para investigar a importância do local de populações de neurônios que expressam PTP1B e medeiam os efeitos do SNC da leptina e insulina, produzimos uma

redução seletiva e transiente da PTP1B através da infusão de um oligonucleotídeo antisense, o qual bloqueia a expressão da PTP1B em áreas hipotalâmicas próximas ao terceiro ventrículo de ratos com obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica (DIO) e ratos submetidos a uma dieta padrão (controle).

É interessante destacar que camundongos deficientes da PTP1B são protegidos da obesidade induzida pela dieta e são hipersensíveis à leptina. No entanto o sítio e o mecanismo desses efeitos permanecem controverso. Estudos usando PTP1B-ASO, o qual reduz os níveis de PTP1B em fígado e adiposo, sugerem que esta fosfatase regula a homeostase da glicose e adiposidade através de ações nesses tecidos. Porém somente a perda neuronal da PTP1B causa um significativo decréscimo na adiposidade (Bence et al., 2006). Bence et al., 2006, no entanto, demonstraram recentemente que camundongos PTP1B^{-/-} neuronal tem redução no peso corporal, adiposidade e aumento na atividade e gasto energético. Esses autores mostraram que camundongos PTP1B^{-/-} neuronal são hipersensíveis à leptina com paradoxical níveis elevados de leptina, além disso também exibem uma melhora na homeostase da glicose. Em contraste, a deficiência de PTP1B no tecido adiposo aumenta o peso corporal e a deleção da PTP1B no fígado e tecido muscular não afeta o peso. Esse importante estudo demonstra que a PTP1B regula massa corporal e adiposidade através do cérebro. No entanto, mais estudos precisam ser realizados em diferentes modelos animais.

Mostramos que, no hipotálamo dos ratos-DIO, há um aumento significativo na expressão e atividade da PTP1B. O tratamento icv desses ratos-DIO, com PTP1B-ASO, induziu um decréscimo marcante e seletivo da expressão da PTP1B em discretos núcleos hipotalâmicos, principalmente no núcleo arqueado. Na primeira etapa deste estudo examinamos os efeitos metabólicos e moleculares da ação da leptina após a inibição por um curto período de tempo da expressão da PTP-1B em ratos DIO e controle. Estes resultados demonstram que a diminuição seletiva da expressão da PTP1B hipotalâmica em ratos que receberam PTP1B-ASO resultou em rápido decréscimo na ingestão alimentar basal, redução do peso corporal e redução da adiposidade em ratos-controle e DIO. Esses dados sugerem uma melhora na sensibilidade à leptina. Além da redução basal na ingestão

alimentar em ratos tratados icv com PTP1B-ASO, houve um aumento na supressão de 12 horas da ingestão alimentar em resposta à leptina.

A sinalização da leptina no hipotálamo ocorre através da ligação da leptina ao Obr (receptor de leptina) ativando a proteína tirosina quinase associada à proteína Jak-2 (Zabolotny et al., 2002). A Jak-2 ativada se autofosforila e fosforila os resíduos Tyr985 e Tyr1138 do Obr. Tyr1138 recruta e ativa o fator de transcrição Stat3 (Zabolotny et al., 2002).

O mecanismo que controla e finaliza a transdução de sinal da leptina inclui a desfosforilação e inativação da sinalização de proteínas mediada por proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) (Haspel et al., 1996; Kaszubska et al., 2002). O caráter transiente da fosforilação em tirosina da Jak-2 e Stat3 sugere o envolvimento de proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) como reguladores negativo dessa via de sinalização. Os dados desta pesquisa mostraram um aumento na atividade tirosina fosfatase, atividade PTPase associada a Jak-2, e diminuição nos níveis de fosforilação de Jak-2 em ratos-DIO. A resistência à leptina em ratos-DIO foi também evidenciada por um decréscimo na fosforilação em tirosina do Obr e Stat3 estimulada pela leptina. Essas alterações foram completamente revertidas em ratos-DIO tratados com PTP1B-ASO. Além disso, houve uma extensão no time-course nos níveis de fosforilação em tirosina de Jak-2, Obr e Stat3, após estímulo com leptina em ambos ratos-controle e DIO tratados com PTP1B-ASO.

No presente estudo, demonstramos que a diminuição seletiva da PTP1B hipotalâmica em ratos que receberam PTP1B-ASO, resultou no decréscimo da ingestão alimentar, redução do peso corporal, adiposidade e melhora da ação e sinalização da leptina após uma dieta rica em gordura. Em contraste camundongos $PTP^{-/-}$, submetidos a uma dieta rica em gordura, exibem uma melhora na sensibilidade à leptina associada a um aumento nos níveis de leptina (Bence et al., 2006). No entanto, nossos resultados mostram que ratos- DIO, tratados icv com PTP1B-ASO, apresentam um aumento na sensibilidade à leptina acompanhada de uma diminuição nos níveis de leptina. Este resultado intrigante pode sugerir que a reversão da resistência à leptina, através da redução da expressão hipotalâmica da PTP1B pode ser diferente da situação em camundongos $PTP^{-/-}$ neuronal submetidos a uma dieta rica em gordura, onde a indução da resistência à leptina é

previnida. Considerando o modelo animal apresentado aqui, com tratamento durante dois meses com uma dieta rica em gordura seguido através de uma redução hipotalâmica da PTP1B, pode ser relevante para situações clínicas como em pacientes com obesidade e resistência à leptina e podemos prever que drogas que possam ser alvo terapêutico para PTP1B hipotalâmica na obesidade podem melhorar a ação da leptina e provavelmente levar a um decréscimo e não a um aumento nos níveis de leptina.

Além da leptina, também a insulina é capaz de reduzir a ingestão alimentar (Carvalho et al., 2005), sendo a PTP1B uma reguladora negativa da sinalização da insulina (Elchebly et al., 1999). Desse modo, o segundo objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos metabólicos e moleculares da ação da insulina, após a redução da expressão hipotalâmica da PTP1B em ratos DIO e controle. Inicialmente, investigamos o efeito da infusão icv de insulina sob a ingestão alimentar e sinalização da insulina nesses ratos. Ratos-DIO e controle, tratados icv com PTP1B-ASO, exibiram uma redução basal na ingestão alimentar, e ainda demonstraram um claro aumento na supressão de 12 horas da ingestão alimentar em resposta à insulina.

No hipotálamo de ratos-DIO, houve um decréscimo na fosforilação em tirosina e um aumento na atividade PTP associada ao IR. Com a redução da expressão da PTP1B a atividade PTP associada ao IR sofreu uma redução significativa e houve uma melhora do nível de fosforilação do IR, IRS-1 e IRS-2 em ratos-DIO e controle. Interessantemente, a redução na expressão da PTP1B também estendeu o time course da fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e IRS-2 induzida pela insulina em ratos-controle e DIO.

Para avaliar o impacto da redução hipotalâmica da PTP1B sob a ação periférica da insulina, realizamos estudos com “clamp” hiperinsulinêmico euglicêmico em ratos. Como resultado do aumento das concentrações de insulina no plasma, a taxa de infusão de glicose necessária para manter os níveis basais de glicose no plasma, foi similar em ratos tratados com PTP1B-ASO e ratos-controle tratados com uma dieta-padrão. Entretanto, a redução da taxa de infusão observada em ratos-DIO foi completamente revertida nesses animais após o tratamento icv com PTP1B-ASO. A ação da insulina sob o metabolismo de glicose inclui a estimulação da captação de glicose e inibição da produção de glicose. A ação da insulina sobre a captação periférica da glicose, foi reduzida e houve também uma

diminuição na produção hepática de glicose. Essas alterações foram completamente revertidas quando animais DIO foram tratados com PTP1B-ASO. Desse modo, a ação hepática e tecido muscular foi normalizada em ratos-DIO, após a redução seletiva da expressão hipotalâmica da PTP1B. A melhora do sinal insulínico hipotalâmico provocado pela redução seletiva da PTP1B em hipotálamo foi suficiente para melhorar a ação da insulina no tecido hepático e muscular em ratos-DIO e controle.

Nosso estudo demonstrou uma função hipotalâmica importante para a PTP1B na modulação do balanço energético, ação da insulina e leptina, e metabolismo de glicose. Desse modo, a redução hipotalâmica da PTP1B mostrou ser suficiente para promover redução apreciável de peso e melhora na sensibilidade à insulina e leptina e no controle da homeostase glicêmica.

Esses achados oferecem novos subsídios para o entendimento do sítio de ação da PTP1B no mecanismo de resistência à leptina e insulina neste modelo animal.

CONCLUSÃO



Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

- Ratos-DIO têm um aumento da expressão e atividade da PTP1B em hipotálamo, sendo esta expressa principalmente no núcleo arqueado;
- A inibição da expressão da PTP1B hipotalâmica promove redução da ingestão alimentar, peso corporal, massa de tecido adiposa (epididimal e retroperitoneal), níveis plasmáticos de insulina e leptina;
- A redução da PTP1B hipotalâmica melhora a sinalização da insulina e leptina;
- O tratamento com PTP1B-ASO por via icv diminuiu a produção de glicose no fígado e melhorou a captação no músculo esquelético;
- Portanto, a PTP1B participa do controle da ação da insulina e leptina no hipotálamo e dessa forma torna-se um alvo interessante para a abordagem terapêutica da obesidade;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Ahmad F, Goldstein BJ. Increased abundance of specific skeletal muscle protein tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. *Metabolism* 1995; 44: 1175-1184.

Araújo EP, Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJA, Velloso LA. Short-Term *in Vivo* Inhibition of Insulin Receptor Substrate-1 Expression Leads to Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Increased Adiposity. *Endocrinology* 2005; 146: 1428–1437.

Asante-Appiah E, Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:E663-70.

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Yu B, Avignon A, Galloway L, Karnam P, Moscat J, Farese RV. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272: 2551-8.

Bence KK, Delibegove M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Khan BB. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 2006; 8: 917-24.

Bjorbaek C, Uotani S, Silva B, Flier SJ. Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 32686-32695.

Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:305-31.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296, 1655-1657.

Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001; 500:119-24.

Carvalho JB, Ribeiro EB, Araujo EP, Guimaraes RB, Telles MM, Torsoni M, Gontijo J A, Velloso LA, Saad MJ. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 2003; 46: 1629-1640.

Carvalho JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Cross-talk between the insulin and leptin signalling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 2005; 3:48-57.

Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP., Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, e Tremblay ML. Attenuation of Leptin Action and Regulation of Obesity by Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Developmental Cell* 2002; 2: 497-503.

Clampit JE, Meuth JL, Smith HT, Reilly RM, Jirousek MR, Trevillyan JM, Rondinone CM. Reduction of protein tyrosine – 1B increases insulin signaling in FAO HEPATOMA cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 261-267.

Dadke SS, Li HC, Kusari AB, Begum N and Kusari J. Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 583-589.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999; 283:1544-8.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004; 116:337-50.

Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn C R. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 1992; 267: 22171-22177.

Goldstein BJ. Protein –Tyrosine Phosphatases: Emerging targets for therapeutic intervention in the 2 diabetes and related states of insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 8: 2474-2480.

Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA, Trevillyan JM, Ulrich RG, Jirousek MR, Rondinone CM. Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin- dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 2003; 52: 21-28.

Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 1996; 15: 6262-8.

Horvath, TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 2005; 8: 561-565.

Johnson AK, Epstein AN. The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 1975; 86: 3999-418.

Johnson TO, Ermolieff J, Jirousek MR. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:696-709.

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 1982; 215:185-7.

Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger E, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol cell Endocrinol* 2002; 195: 109-18.

Kennedy JW, Hirshman MF, Gervino EV, Ocel JV, Forse RA, Hoenig SJ, Aronson D, Goodyear LJ, Horton ES. Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48:1192-7.

Kennedy BP, Ramachandran C. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60: 877-883.

Kopelman, PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-643.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003; 278:2896-902.

Marx J. Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* 2003; 299: 846-849.

Munzberg H, Myers MG, Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005; 8:566-70.

Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse Models of Insulin Resistance. *Physiol Rev* 2004; 84: 623-647.

Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, Seeley RJ, and Schwartz MW. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 2003; 52: 227-231.

Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AchE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 1980; 3: 129-149.

Plum L, Schubert M, Bruning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 59-65.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion *Endocrinology* 2005; 146:1576-87.

Prada, PO, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension* 2000; 35: 424-429.

Rondinone CM, Trevillyan JM, Clampit J, Gum RJ, Berg C, Kroeger P, Frost L, Zinker BA, Reilly R, Ulrich R, Butler M, Monia BP, Jirousek MR, Waring JF. Protein tyrosine phosphatase 1B reduction regulates adiposity and expression of genes involved in lipogenesis. *Diabetes* 2002; 51: 2405-2411.

Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-serine phosphorylation. *J Physiol* 2006; 577:997-1007.

Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 1996; 271:22100-4.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414:799-806.

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

Schwartz MW, Porte D Jr. Diabetes, obesity, and the brain 2005; 307:375-9.

Snyder EE, Walts B, Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res* 2004; 12:369-439.

Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem* 2002; 277: 793-803.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83:1263-71.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272:6093-6

Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E216-23.

Ukkola O, Santaniemi M. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. *J Intern Med* 2002; 251:467-75.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 12490-12495.

Venable CL, Frevert EU, Kim YB, Fischer BM, Kamatkar S, Neel BG, Kahn BB. Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 18318-18326.

White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40 2: 2-17.

Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest.* 2005; 115: 951-8.

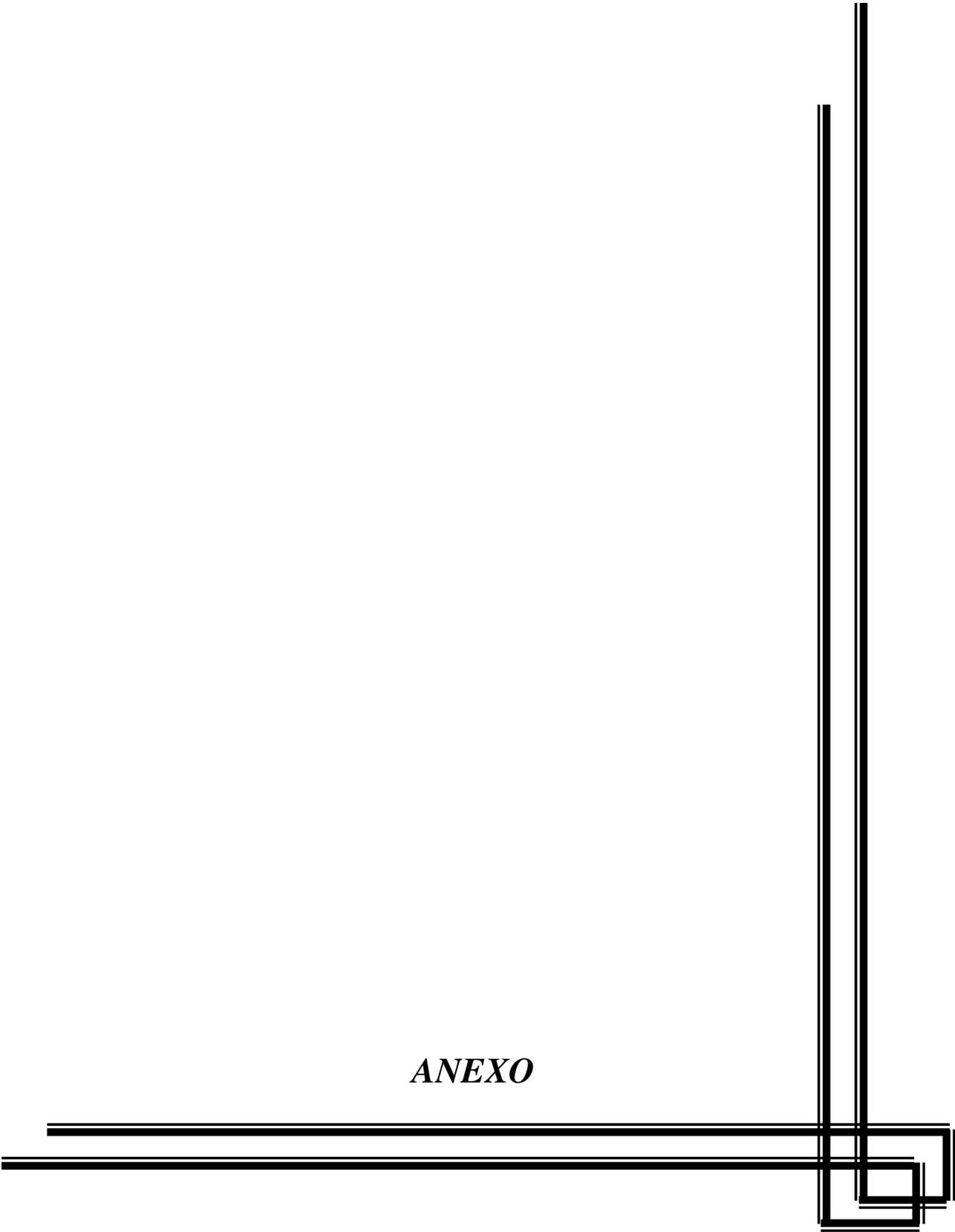
Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett* 2003; 546: 45-50.

Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG. *Developmental Cell* 2002; 2: 489-495.

Zinker BA, Rondinone CM, Trevillyan JM, Gum RJ, Clampit JE, Waring JF, Xie N, Wilcox D, Jacobson P, Frost L, Kroeger PE, Reilly RM, Koterski S, Ogenorth TJ, Ulrich RG, Crosby S, Butler M, Murray SF, McKay RA, Bhanot S, Monia BP, Jirousek MR. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 11357-11362.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.

ANEXO



Reduction of hypothalamic PTP1B improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats

Paty Karoll Picardi, Vivian Cristine Calegari, Patrícia de Oliveira Prada, Juliana Contin Moraes, Eliana Araújo, José Barreto Campello Carvalheira, Licio Augusto Velloso, Mario José Abdalla Saad

Departamento de Clínica Médica, FCM, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Please address correspondence to: Mario José Abdalla Saad, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brasil, 13081-970, Fax: +55 19 35218950, e-mail: msaad@fcm.unicamp.com.br

RUNNING TITLE: hypothalamic PTP1B and insulin action

KEYWORDS: PTP1B, obesity, insulin action, leptin action, insulin signaling

Abbreviations used are: **DIO**, diet-induced obesity; **IR**, insulin receptor; **IRS**, insulin receptor substrate; **icv**, intracerebroventricular infusion; **PTP1B**, protein tyrosine phosphatase 1B ; **2DG**, 2-deoxyglucose; **HGO**, hepatic glucose output;

Abstract

Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) has been implicated in the negative regulation of insulin and leptin signaling. PTP1B knockout mice are hypersensitive to insulin and leptin and resistant to obesity when fed a high-fat diet. We investigated the role of hypothalamic PTP1B in the regulation of food intake, insulin and leptin actions and signaling in rats through selective decreases in PTP1B expression in discrete hypothalamic nuclei. We generated a selective, transient reduction in PTP1B by infusion of an antisense oligonucleotide designed to blunt the expression of PTP1B in rat hypothalamic areas surrounding the third ventricle, in control and obese rats. The selective decrease in hypothalamic PTP1B resulted in decreased food intake, reduced body weight, reduced adiposity and reduced leptin levels after high-fat feeding, improved leptin and insulin action and signaling in hypothalamus and also in insulin action in liver and muscle.

Introduction

Insulin and leptin have been postulated to be signals for the long-term regulation of body weight by the brain and exert overlapping effects on hypothalamic neurons involved in energy homeostasis (1). Insulin receptors and leptin receptors are expressed by brain neurons involved in energy intake, and administration of either peptide, directly into the brain, reduces food intake, whilst deficiency of either hormone results in the converse (2). Although humans with severe obesity, due to mutation of leptin or its receptor, have been described, most forms of human obesity are characterized by normal or increased circulating levels of insulin and leptin, and are without any known defect in receptors for these two adiposity signals. Thus, common forms of obesity in both humans and animal models are hypothesized to involve resistance to the actions of insulin and leptin downstream of their neuronal receptors, affecting the brain pathways that mediate their effects on energy balance (3), but the means by which they become resistant to input from insulin and leptin signals are not completely known.

Protein tyrosine phosphatase (PTP1B) has been implicated in the negative regulation of insulin and leptin signaling (3,4). Previous studies have demonstrated that PTP1B knockout mice are hypersensitive to insulin and leptin and resistant to obesity when fed on a high-fat diet (4). Recently, Bence et al. (5) demonstrated that neuronal PTP1B^{-/-} mice have reduced body weights and adiposity, and increased activity and energy expenditure. These authors showed that PTP^{-/-} mice are hypersensitive to leptin, despite paradoxically-elevated leptin levels, and also show improved glucose homeostasis. Although tissue-specific knockout mice provide important mechanistic information, in this specific case, some questions remain to be delineated in control and in obese rats; 1- the importance of local populations of neurons expressing PTP1B in mediating the CNS effects of leptin and insulin, 2- whether leptin levels are also elevated in other models with selective decreases in PTP1B expression in discrete hypothalamic nuclei, and 3- which peripheral tissues are involved in the improvement in glucose homeostasis. The aim of the present study was to investigate these specific questions. To address these questions, we generated a selective, transient reduction in PTP1B by infusion of an antisense oligonucleotide designed to blunt the expression of PTP1B in rat hypothalamic areas surrounding the third ventricle. Our results show that hypothalamic PTP1B reduction

should be sufficient to promote appreciable weight reduction and improve insulin and leptin sensitivity and signaling and glucose homeostasis in DIO rats.

Materials and Methods

Chemicals, antibodies, and oligonucleotides

Antibodies anti-IR, IRS-1, IRS-2, Obr, Jak-2, Stat3 and phosphotyrosine were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-PTP1B (AB-1 mouse polyclonal) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). pp60^{src} C-terminal phosphoregulatory peptide (TSTEPQpYQPGENL; where pY represents phosphotyrosine and Biomol Green reagent were purchased from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Reagents for SDS/PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Tris [hydroxymethyl] amino-methane (Tris), Hepes, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, glycerol, tween 20 and bovine serum albumin (BSA, fraction V) were from Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), ¹²⁵I-Protein A, nitrocellulose membranes HPLC-purified [3-³H]glucose and 2-deoxy-D-[1-¹⁴C]glucose (2-[¹⁴C]DG1) were obtained from Amersham (Amersham Biosciences Group, Little Chalfont, UK). The Harvard apparatus (model 11) and Harvard compact infusion pumps (model 975) were obtained from South Natick, MA. Human recombinant insulin was from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN, USA). Leptin was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Ketamine hydrochloride was from Fort Dodge Laboratories Inc. (Fort Dodge, IA, USA). Sodium thiopental was from Abbott Laboratories (North Chicago, Illinois, USA). Sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides specific for PTP1B (sense, 5'- **AAA GTG CTG TTG G** -3' and antisense, 5'-**CCA ACA GCA CTT T**-3') were produced by Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Kits for measuring insulin and leptin were obtained from Amersham Biosciences, (Biotrak, Aylesbury, UK).

Animals and surgical procedures.

Adult male Wistar rats from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. All experiments were approved by the Ethics Committee at the State University of Campinas. Four-week-old male Wistar rats

were divided into two groups: control rats (C), fed with standard rodent diet (carbohydrate: 70%; protein: 20%; fat: 10%, totaling 3.8 kcal/g), and rats with induced-diet obesity (DIO), fed on a high-fat diet (carbohydrate: 38.5%; protein: 15%; fat: 46.5%, totaling 5.4 kcal/g) for 2 months.

All rats were anesthetized with Ketamine hydrochloride and, after loss of corneal and pedal reflexes, were positioned on a Stoelting stereotaxic apparatus. A 23-gauge guide stainless steel cannula with an indwelling 30-gauge obturator was stereotaxically implanted intracerebroventricularly (icv) into the third ventricle by use of previously reported techniques and pre-established coordinates (6). Rats were allowed 1 week for recovery before testing for cannula patency and position. Cannulas were considered patent and correctly positioned by dyspogenic response elicited after angiotensin II injection (7).

Animal characterization

Metabolic parameters

At the end of the diet period and treatment with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense, the body weight and retroperitoneal and epididymal fat pad were measured. Food was withdrawn 12 h before the experiments. Blood samples of 0.5 ml were collected from the tail for the determination of the serum concentrations of insulin and leptin levels, which were measured by radioimmunoassay.

Protocol for food ingestion determination

For both groups (control and DIO), at the end PTP1B-ASO or PTP-1B-Sense period, icv cannulated rats were food deprived for 6h (from 12 to 18 h) and at 18 h were icv treated with insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M), leptin (2.0 μ l, 10^{-6} M) or saline (2.0 μ l). Food ingestion was determined over the next 12 h.

Tissue extraction, immunoprecipitation, and immunoblotting.

Rats were anesthetized with sodium thiopental, and as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the rats were icv treated with insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M), leptin (2.0 μ l, 10^{-6} M) or saline (2.0 μ l), and after 15 minutes subjected to

craniotomy (3,8). Hypothalami were obtained and homogenized in freshly prepared ice-cold buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.01 mg aprotinin/ml). Insoluble material was removed by centrifugation (15,000 rpm) for 40 min at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method (9). Aliquots of the resulting supernatants containing 2.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with specific antibodies, at 4°C overnight, followed by addition of protein A-Sepharose 6MB for 2 h. The pellets were washed three times in ice-cold buffer (0.5% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, 10 mM EDTA, and 2 mM sodium vanadate) and then resuspended in Laemmli sample buffer (10) and boiled for 5 min, after which they were subjected to SDS-PAGE in a miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). For total extracts, 0.2 mg of protein were separated by SDS-PAGE. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 120 min at 120V in a Bio-Rad Mini-Protean transfer apparatus. Non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by pre-incubating the filter for 2 h in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.02% Tween 20) (11). The nitrocellulose blot was incubated with specific antibodies overnight at 4°C and then incubated with ¹²⁵I-labeled protein A. Results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp).

Phosphorothioate-modified oligonucleotide treatment

The sequences of sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides, specific for PTP1B (sense, 5'-AAA GTG CTG TTG G -3' and antisense, 5'- CCA ACA GCA CTT T -3'), were selected among three unrelated pairs of oligonucleotides on the basis of their ability to block PTP1B protein expression, as evaluated by immunoblotting total protein extracts of hypothalamus using specific anti-PTP1B antibodies. The antisense oligonucleotide sequences were submitted to BLAST analyses (www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for the *Rattus norvegicus* PTP1B coding sequence.

Control and DIO were cannulated, housed in individual cages and treated with sense oligonucleotide (PTP1B-Sense) or PTP1B antisense oligonucleotide (PTP1B-ASO).

Sense and antisense PTP1B oligonucleotides were diluted in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and treatment was achieved by icv infusions, twice a day (8:00h/18:00h) with a total vol of 2.0 μ l per dose (4.0 nmol/ μ l) for 4 days.

Immunohistochemistry

Rat hypothalami were fixed in 4% paraformaldehyde-0.2 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for 24 h and embedded in paraffin, and 5.0 μ m sections were obtained. The glass-mounted sections were cleared from paraffin with xylene and rehydrated by sequential washings with graded ethanol solutions (70–100%). After permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS, pH 7.4, for 10 min at room temperature, the sections were incubated with the primary antibody (mouse anti-PTP1B) in 1% BSA in PBS at 4°C in a moisture chamber. After incubation with the primary antibody, sections were washed and incubated with FITC-conjugated secondary antibodies, and analysis and photo documentation were performed using a Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope, according to a previously described technique (12).

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies

After 12 h of fasting, animals were anesthetized intraperitoneally with a mix of ketamin (100 mg) and diazepam (0.07 mg) (0.2 ml/100 g body weight) and catheters were then inserted into the left jugular vein (for tracer infusions) and carotid artery (for blood sampling), as previously described (13). A 120-min hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedure was conducted in anesthetized catheterized rats, as shown previously (13) and (14), with a prime continuous infusion of human insulin at a rate of 3.6 mU/kg body wt/min to raise the plasma insulin concentration to approximately 800–900 pmol/l. Unlabeled glucose (10%) was infused at variable rates to maintain plasma glucose at fasting levels. Insulin-stimulated whole-body glucose flux was estimated using a prime continuous infusion of HPLC-purified [3-³H]glucose (10 μ Ci bolus, 0.1 μ Ci/min) throughout the clamp procedure (15). To estimate insulin-stimulated glucose-transport activity and metabolism in skeletal muscle, 2-[¹⁴C]DG1 was administered as a bolus (10 μ Ci) 45 min before the end of the clamp procedure. Blood samples (20 μ l) were taken at 80, 90, 100, 110, and 120 min after the start of the clamp procedure to determine plasma [³H]glucose and 2-[¹⁴C]DG1 concentrations. All infusions were performed using Harvard infusion pumps. At the end of

the clamp procedure, animals were killed by a mix of ketamin and diazepam intravenous injection. Within 2 min, two skeletal muscles (soleus and gastrocnemius) from both hind limbs were taken. Each tissue, once exposed, was dissected out within 2 sec, weighed, frozen with liquid N₂, and stored at -70°C for later analysis. In separate experiments, the basal rates of glucose turnover were measured by continuously infusing [3-³H]glucose (0.02 µCi/min) for 120 min, and blood samples (20 µl) were taken at 100, 110, and 120 min after the start of the experiment for the determination of plasma [³H]glucose concentration. The hepatic glucose output (HGO) during the clamp procedure was therefore obtained from the difference between the whole-body glucose uptake and the rate of unlabeled glucose infusion. Glucose transport activity in skeletal muscle was calculated from the plasma 2-[¹⁴C]DG profile, according to a previously described (14,16).

Protein tyrosine phosphatase activity assay

The *in vitro* PTP1B activity assay was conducted based on a protocol previously described by Taghibiglou *et al* (17). Hypothalami were removed and homogenized in the solubilization buffer containing 1% Triton X-100, 20 mM, Tris (pH 7.6), 5 mM EDTA, 2 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/mL, 1mM EGTA and 130mM NaCl. Lysates were centrifuged (15.000 rpm, 40 min, 4°C) and the supernatants were collected for immunoprecipitation with anti- IR, anti-Jak-2 and anti-PTP1B antibodies, as described previously. Immunoprecipitates were washed in PTP assay buffer (100mM HEPES (pH 7.6), 2 mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 150mM NaCl, 0,5mg/mL bovine serum albumin). The pp60^{c-src} C-terminal phosphoregulatory peptide (TSTEPQpYQPGENL; Biomol) was added to a final concentration of 200µM in a total reaction volume of 60µL in a PTP assay buffer for immunoprecipitation. The activity of total extracts (125µg) was measured in the same manner in a total reaction volume of 60µL in a PTP assay buffer, adding the peptide to a final concentration 200µM. The reaction was then allowed to proceed for 1 h at 30°C. At the end of the reaction, 40µL aliquots were placed into 96-well plates, 100µL of Biomol Green reagent (Biomol) was added, and absorbance was measured at 660nm.

Data presentation and statistical analysis.

Data were expressed as means \pm SEM accompanied by the indicated number of independent experiments. For statistical analysis, the groups were compared using a two-way ANOVA with the Bonferroni test for *post hoc* comparisons. The level of significance adopted was $P < 0.05$.

Results

ICV PTP1B antisense oligonucleotide decreases PTP1B protein in the hypothalamus

We administered PTP1B antisense oligonucleotide (PTP1B-ASO) and PTP1B sense oligonucleotide (PTP1B-Sense) by infusion in the third ventricle, of control and DIO rats and assessed the effects on PTP1B protein by immunoblotting and by brain immunohistochemistry. The potency of PTP1B-ASO was tested in a dose–response experiment. Two daily doses of 4 nmol PTP1B were sufficient to inhibit PTP1B expression by 70% in control rats. (Fig.1A). Hypothalamic levels of PTP1B were increased in DIO rats compared with control rats and there was a marked decrease after PTP1B-ASO (Fig. 1A). We confirmed the selective inhibition of PTP1B in the hypothalamus by immunohistochemistry (Fig. 1B). Substantial reductions of expression were determined in arcuate and lateral nuclei of hypothalamus, with no changes in frontal and parietal cortex, hippocampus and cerebellum. Furthermore, the effect of the PTP1B ASO was confined to the hypothalamic area since PTP1B protein levels were not reduced in skeletal muscle, liver and adipose (data not shown).

Metabolic characteristics

At the end of 4 days of treatment with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense, we evaluated the *in vivo* effect of hypothalamic PTP1B reduction on food intake, body weight, epididymal and retroperitoneal fat, leptin and insulin levels. In control and DIO rats treated with PTP1B-ASO, there were reductions in food intake of 50% and 70%, respectively (Fig. 2A). These reductions in food intake were accompanied by a mild decrease in body weight in control rats and by a moderate decrease in DIO rats after 4 days of PTP1B-ASO treatment (Fig. 2B). Control and DIO rats had a mild reduction in adiposity after treatment

with PTP1B-ASO, as shown by lower epididymal and retroperitoneal fat pad weight (Fig. 2C). The treatment with PTP1B-ASO produced a significant decrease in fasting insulin and leptin levels in controls and DIO rats treated with PTP1B-ASO compared with controls and DIO rats treated with PTP1B-Sense, respectively (Fig. 2 D and E).

Effect of reduction of PTP1B on leptin-induced satiety and leptin signal transduction

Leptin provides the robust anorexigenic signal to the hypothalamus. To evaluate the effect of hypothalamic PTP1B reduction upon leptin action in the hypothalamus, control and DIO rats, at end of 4 days of treatment with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense, were acutely treated with saline 2 μ l, or leptin (2 μ l, 10^{-6} M) icv, and food intake was measured over the next 12h. Leptin infusion reduced food intake by 42% and 19% in controls and DIO rats treated with PTP1B-Sense, respectively, as depicted in Fig. 3A. Hypothalamic PTP1B reduction significantly increased leptin-induced suppression of food ingestion to 60% and 85%, for control and DIO treated with PTP1B-ASO. Thus, hypothalamic PTP1B reduction led to a significant improvement in the leptin-induced anorexigenic effect, which is more evident in DIO rats.

Basal Jak-2 tyrosine phosphorylation was increased in the hypothalamus of control rats treated with PTP1B-ASO. In these animals, there was also a higher increase in Jak-2 tyrosine phosphorylation after 15 min of icv leptin infusion, which was maintained at 60 min. In DIO rats basal and leptin-induced Jak-2 phosphorylation were reduced when compared to controls (Fig. 3B). DIO rats demonstrated increases in the basal and leptin-stimulated association between Jak-2/PTP1B (Fig. 3C). As expected, treatment with PTP1B-ASO reduced Jak-2/PTP1B association in control and DIO rats. DIO rats treated with PTP1B-ASO presented an increase in basal and leptin-induced Jak-2 tyrosine phosphorylation, and this increase was maintained 60 min after leptin infusion, similarly to that seen in of PTP1B-ASO control rats. In control rats treated with PTP1B-ASO, there was also increased basal Obr tyrosine phosphorylation. In these animals a higher increase in Obr tyrosine phosphorylation was also observed after 15 min of icv leptin infusion, which was maintained at 60 min. There was a reduction in basal and leptin-induced Obr phosphorylation in DIO rats compared to controls. Treatment with PTP1B-ASO increased the basal and leptin induced Obr tyrosine phosphorylation in DIO rats and this increase was

maintained 60 min after leptin infusion (Fig. 3D). Basal Stat3 tyrosine phosphorylation was increased in the hypothalamus of control rats treated with PTP1B-ASO. In these animals there was also a greater increase in Stat3 tyrosine phosphorylation after 15 min of icv leptin infusion, which was maintained at 60 min. Basal and leptin-induced Stat3 phosphorylation were reduced in DIO rats when compared to controls. DIO rats treated with PTP1B-ASO demonstrated an increase in basal and leptin induced Stat3 tyrosine phosphorylation, and this increase was maintained 60 min after leptin infusion (Fig. 3E).

Effect of reduction of PTP1B on insulin-induced satiety and insulin signal transduction

To evaluate the effect of hypothalamic PTP1B reduction upon insulin action in the hypothalamus of control and DIO rats, at the end of 4 days of treatment with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense the animals were acutely treated with saline 2 μ l, or insulin (2 μ l, 10^{-6} M) icv, and food intake was measured over the next 12 h. Insulin infusion induced reductions of 32% and 23% in food intake in controls and DIO rats treated with PTP1B-Sense, respectively, as depicted in Fig. 4A. Hypothalamic PTP1B reduction significantly increased insulin-induced suppression of food ingestion to 78% and 95%, in control and DIO rats treated with PTP1B-ASO. Thus, hypothalamic PTP1B reduction led to a significant improvement in the insulin induced anorexigenic effect.

After treatment with PTP1B-ASO, there was an increase in basal and insulin-induced IR tyrosine phosphorylation after 15 min and 60 min of icv insulin infusion, in control rats. In DIO rats, basal and insulin-induced IR phosphorylation were reduced when compared to controls (Fig. 4B). DIO rats demonstrated increases in the basal and insulin-stimulated association between IR/PTP1B (Fig. 4C). As expected, treatment with PTP1B-ASO reduced IR/PTP1B association in control and DIO rats. DIO rats treated with PTP1B-ASO presented an increase in basal and insulin-induced IR tyrosine phosphorylation, and this increase was maintained 60 min after insulin infusion, in a similar manner to that of PTP1B-ASO control rats. In control rats treated with PTP1B-ASO, basal IRS-1 tyrosine phosphorylation was increased and a greater increase in IRS-1 tyrosine phosphorylation was also observed after 15 min of icv insulin infusion, which was

maintained at 60 min. A reduction in basal and in insulin-induced IRS-1 phosphorylation was seen in DIO rats compared to controls. Treatment with PTP1B-ASO increased basal and insulin-induced IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation after 15 min insulin infusion in DIO rats, and this increase was maintained 60 min after insulin infusion (Fig.4 D and E).

Effect of reduction in PTP1B on glucose metabolism

To further understanding of glucose utilization in control and DIO rats treated icv with PTP1B-ASO and PTP1B-Sense, we performed hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies. The procedure was performed with tracer infusions to examine the effects of PTP1B-ASO in the hypothalamus on the metabolism of glucose in liver and skeletal muscle tissue. The glucose infusion rate necessary to maintain euglycemia at fasting levels in the presence of a constant infusion of insulin (3.6mU/Kg body weight/min) was slightly higher in control rats treated with PTP1B-ASO, compared with controls treated with PTP1B-Sense, respectively (Fig. 5A). There was a significant reduction in the glucose infusion rate in DIO rats, which was reversed when the animals were treated with PTP1B-ASO. Insulin-stimulated glucose uptake was quantified using 2DG uptake analysis in skeletal muscle tissue. The glucose uptake into skeletal muscle was significantly reduced in DIO rats treated with PTP1B-Sense, and this alteration was completely reversed in DIO rats treated with PTP1B-ASO (Fig. 5B). Fig. 5C, demonstrates that the insulin-induced decrease in hepatic glucose production (HGO) was blunted in DIO rats treated with PTP1B-Sense, but when these animals were treated with PTP1B-ASO, the insulin effect was completely reversed.

Hypothalamus PTPase and PTP1B activities

PTPase activity increases in the insulin-resistant state correlating with increased PTP1B protein expression (18). Consistent with this finding, we observed an increased in hypothalamic PTPase activity in DIO rats compared with control rats. After treatment with PTP1B-ASO, PTPase activity decreased in control and DIO rats (Fig. 6A). To specifically investigate PTP1B activity, we measured the activity of this enzyme in immunoprecipitates of PTP1B. Results demonstrate that PTP-1B activity was increased in the hypothalamus of DIO rats compared with controls rats. After treatment with PTP1B-ASO, a reduction in PTP1B activity was observed in control and DIO rats (Fig. 6B).

In addition to total PTPase activity we also measured PTPase activity in IR and Jak-2 immunoprecipitates and found an increase in IR and Jak-2 associated PTPase activity in DIO rats, compared with control rats, respectively (Fig. 6C and D). After treatment with PTP1B-ASO, there was a decrease in these associated activities in control and DIO rats.

Discussion

Resistance to leptin and insulin is likely to play a central role in obesity; however the mechanism by which insulin and leptin signaling becomes impaired is poorly understood. Genetic and biochemical evidence for an important role of PTP1B as a negative regulator of insulin and leptin-induced metabolic actions was emerged in recent years (19). Several studies have examined PTP1B expression in rodents and humans with insulin resistance, diabetes and obesity. Many reports have shown increased expression and/or activity of PTP1B in these states (20, 21, 22, 23). Mice lacking PTP1B are protected from diet-induced obesity and are hypersensitive to leptin, however the site and mechanism of these effects remain controversial. Studies using PTP1B-ASO, which lowers PTP1B levels in liver and fat, suggest that this phosphatase regulates glucose homeostasis and adiposity primarily through actions on these tissues. Bence et al. (5), however, recently demonstrated that neuronal PTP^{-/-} mice have reduced body weight and adiposity, and increased activity and energy expenditure. These authors showed that PTP^{-/-} mice are hypersensitive to leptin, despite paradoxically elevated leptin levels, and also show improved glucose homeostasis. In contrast, adipose PTP1B deficiency increases body weight and PTP1B deletion in liver or muscle does not affect weight. This important study demonstrates that PTP1B regulates body mass and adiposity through the brain.

In order to initially investigate the importance of local populations of neurons expressing PTP1B in mediating the CNS effects of leptin and insulin in control and DIO rats, we herein generated a selective, transient reduction in PTP1B by infusion of an antisense oligonucleotide designed to blunt the expression of PTP1B in hypothalamic areas surrounding the third ventricle of rats.

DIO rats have a marked increase in PTP1B protein expression in the hypothalamus. The treatment of these DIO rats with PTP1B-ASO icv, induced a marked and selective decrease in PTP1B expression in discrete hypothalamic nuclei, mainly in arcuate nuclei. The selective decrease in hypothalamic PTP1B protein in rats receiving PTP1B-ASO resulted in a rapid decrease in food intake, reduced body weight and reduced adiposity in control and DIO animals. These data suggest an improvement in leptin sensitivity, which was confirmed by the finding that, in addition to a basal reduction in food intake in rats treated icv with PTP1B-ASO, an enhanced suppression of 12 h food intake was also observed in response to leptin.

Leptin signals in the hypothalamus by binding to a type I cytokine receptor (the leptin receptor, Obr), and activating the associated tyrosine kinase Jak-2 (Janus kinase 2) (24). Activated Jak-2, in turn, phosphorylates itself and residues Tyr985 and Tyr1138 within the Obr cytoplasmic tail. Tyr1138 recruits and activates the transcription factor Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) (24).

The mechanisms controlling and terminating the leptin signal transduction include dephosphorylation and inactivation of signalling proteins, mediated by protein tyrosine phosphatases (PTPs) (25,26). The transient character of the tyrosine phosphorylation of Jak-2 and Stat3 suggests the involvement of protein tyrosine phosphatases (PTPs) as negative regulators of this signalling pathway. Our data showed an increase in tyrosine phosphatase activity, an increase in PTPase activity, associated with Jak-2, and a decrease in JaK-2 tyrosine phosphorylation levels in DIO rats. The leptin resistance in DIO rats was also characterized by a less evident increase in Obr and Stat3 tyrosine phosphorylation evoked by leptin. These alterations were completely reversed in DIO rats treated with PTP1B-ASO. In addition, there was an extension in the time-course of leptin-induced tyrosine phosphorylation levels of Jak-2, Obr and Stat3 both in controls and DIO rats treated with PTP1B-ASO.

In the present study, we demonstrate that the selective decrease in hypothalamic PTP1B protein in rats receiving PTP1B-ASO resulted in decreased food intake, reduced body weight, reduced adiposity after high-fat feeding and improved leptin action and signaling. In contrast to PTP^{-/-} mice on a high-fat diet, which improved leptin sensitivity,

associated with increased leptin levels (5), in DIO rats treated icv with PTP1B ASO, presented an increase in leptin sensitivity accompanied by a decrease in serum leptin levels. This is an intriguing result, but may suggest that reversing leptin resistance, through reductions in hypothalamic PTP1B protein expression differs from the situation of neuronal PTP^{-/-} mice on a high-fat diet, where the induction of leptin resistance is prevented. In this regard, in the animal model presented herein, high-fat diet treatment for 2 months followed by a reduction in hypothalamic PTP1B may be relevant for clinical situations, such as in patients with obesity and leptin resistance, and we may predict that drugs that can target hypothalamic PTP1B in obesity may improve leptin action and will probably lead to a decrease, rather than an increase, in leptin levels.

In addition to leptin, insulin is also able to reduce food intake (8) and PTP1B is a negative regulator of insulin signaling (27). Thus, we also investigated the effect of icv insulin infusion on food intake and insulin signaling in these rats. DIO and control rats treated icv with PTP1B-ASO, whilst demonstrating a reduced basal food intake, still showed a clear suppression in 12 h food intake in response to icv insulin infusion. At a molecular level in the hypothalamus of DIO, there was a decrease in insulin-induced IR tyrosine phosphorylation, and an increase in PTP1B activity associated with IR. The treatment of control and DIO rats with PTP1B-ASO reversed insulin resistance in the hypothalamus of obese rats and also improved insulin signaling in control rats. Interestingly, a reduction in PTP1B expression also extends the time course of insulin-induced IR, IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation in control and DIO rats.

To assess the impact of hypothalamic PTP1B downregulation on the peripheral action of insulin, we performed hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies in conscious rats. As a result of physiological increases in plasma insulin concentrations, the rate of glucose infusion required to maintain the plasma glucose at basal levels was similar in PTP1B antisense-treated rats and in controls on standard rodent chow. However, the reduction in the rate of glucose infusion observed in DIO rats was completely reversed when these DIO animals were treated icv with PTP1B-ASO. The insulin action on glucose metabolism includes stimulation of glucose uptake and inhibition of glucose production. The insulin action on peripheral glucose uptake was reduced and there was also a less evident decrease in hepatic glucose production in DIO rats. These alterations were

completely reversed when the DIO animals were treated icv with PTP1B-ASO. Thus, muscle and hepatic insulin action were normalized in DIO rats after selective attenuation of hypothalamic PTP1B expression.

In conclusion, we have demonstrated an important role of hypothalamic PTP1B in the modulation of energy balance, insulin and leptin action, and glucose metabolism. Thus, the reduction in hypothalamic PTP1B should be sufficient to promote an appreciable weight reduction and access to the brain may also be necessary to optimally improve insulin and leptin sensitivity and glucose homeostasis.

References

1. **Schwartz WM, Porte D.** (2005) Diabetes, Obesity and the Brain *Science* 307: 375-379
2. **Johnson TO, Ermolieff J, Jirousek MR.** (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 1: 696-709
3. **Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ.** (2005) Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146:1576-1587.
4. **Goldstein BJ.** (2002) Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2474-80
5. **Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB.** (2006) Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 8: 917-24.
6. **Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ.** (2001) Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500:119-124
7. **Johnson AK and Epstein AN.** (1975) The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 86: 399-418.
8. **Carvalho JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ.** (2005) Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 13: 48-47.
9. **Bradford MM.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein- dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
10. **Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 11. Saad MJ, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CR, Paiva RS & Velloso LA. (1997)** Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia* 40: 179-186.
- 12. Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. (2003)** Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: 216-23.
- 13. Prada P, MM, Okamoto LN, Furukawa UF, Machado JC, Heimann, M.S. Dolnikoff. (2000)** High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension* 35: 424–429.
- 14. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Amaral MEC, Höer NF, Boschero AC, Saad MJA. (2005)** Western diet modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146: 1576–1587.
- 15. Yang C, Coker KJ, Kim JK, Mora S, Thurmond DC, Davis AC, Yang B, Williamson RA, Shulman GI, Pessin JE. (2001)** Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *J Clin Invest* 107:1311–1318
- 16. Leturque AP, Burnol AF, Penicaud L, Girard J. (1985)** A method to quantify glucose utilization in vivo in skeletal muscle and white adipose tissue of the anaesthetized rat. *Biochem J* 228:103–110
- 17. Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. (2002)** Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem* 277: 793-803
- 18. Kennedy BP. (1999)** Role of protein tyrosine -1B in diabetes and obesity. *Biomedic & Pharmacother* 53: 466-70
- 19. Lund KI, Hansen AJ, Andersen SH, Moller HPN and Billestrup N. (2005)** Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signaling. *J Mol Endocrinol* 34: 339-351

- 20. Ahmad Fand Goldstein BJ.** (1995) Increased abundance of specific skeletal muscle protein tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. *Metabolism* 44: 1175-1184
- 21. Dadke SS, Li HC, Kusari AB, Begum N and Kusari J.** (2000) Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 583-589
- 22. Venable CL, Frevert EU, Kim YB, Fischer BM, Kamatkar S, Neel BG, Kahn BB.** (2000) Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J Biol Chem* 275: 18318-18326.
- 23. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Faria MC, Picardi PK, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira J.** (2006) Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise: The role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*
- 24. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG** 2002 PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2:385-387.
- 25. Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr.** (1996) The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *Embo J.* 22:6262-8.
- 26. Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM.** (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 195:109-18.
- 27. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser JM., Tremblay LM, Kennedy PB.** (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283: 1544–1548

Legends

Fig 1. Immunohistochemical evaluation PTP1B of distribution and expression in hypothalamus of rats treated with PTP1B-ASO. A, Immunoblotting o whole tissue extracts from hypothalamus with anti-PTP1B antibody; B, Paraformaldehyde-fixed rat hypothalamic sections (5 μ m) were incubated with anti-PTP1B, (visualization of immunoreactivity is described in MATERIALS AND METHODS). Figure is representative of three distinct experiments. Specific bands were densitometrically quantified. Data are means \pm SEM of four independent experiments, *i.e.* four different cohorts of control rats or DIO rats. DIO rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO vs PTP1B-Sense ; Control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO vs PTP1B-Sense

Fig 2. Effect of icv PTP1B-ASO on metabolic parameters. A,Basal food intake; B, body weigh; C, epididymal and retroperitoneal adipose tissue mass; D, serum leptin levels; E, serum insulin levels in controls and DIO rats treated with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense. Data are means \pm SEM. Each group was composed of 15 animals. DIO or Control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO vs PTP1B-Sense.

Fig 3. Effect of icv PTP1B-ASO on leptin-induced satiety and leptin signaling in hypothalamus of control and DIO. A, leptin was icv-infused and 12-h food intake was measured in control and DIO rats treated with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense; B, Immunoprecipitation (IP) with anti-Jak-2 and immunoblotting (IB) with anti-pY antibodies; C, IP with anti-Jak-2 and IB with anti-PTP1B; D, IP with anti -Obr and IB with anti-pY; E, IP with anti-Stat3 and IB with anti-pY; Specific bands were densitometrically quantified. Data are means \pm SEM of four independent experiments, *i.e.* four different cohorts of control rats or DIO rats. DIO or Control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO (15' and 1h) vs PTP1B-Sense (15' and 1h).

Fig 4. Effect of icv PTP1B-ASO on insulin-induced satiety and insulin signaling in hypothalamus of control and DIO. A, insulin was icv-infused and 12-h food intake was measured in control and DIO rats treated with PTP1B-ASO or PTP1B-Sense; B, Immunoprecipitation (IP) with anti-IR and immunoblotting (IB) with anti-pY antibodies; C, IP with anti-IR and IB with anti-PTP1B; D, IP with anti-IRS-1 and IB with anti-pY; E, IP with anti-IRS-2 and IB with anti-pY; Specific bands were densitometrically quantified. Data are means \pm SEM of four independent experiments, *i.e.* four different cohorts of control rats or DIO rats. DIO or Control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO (15' and 1h) vs PTP1B-Sense (15' and 1h).

Fig. 5. A, Steady-state glucose infusion rates obtained from averaged rates of 90–120 min of 10% unlabeled glucose infusion during hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedures in the control and DIO; B, Glucose transport in skeletal muscle tissue evaluated by 2DG uptake during the last 45 min of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies; C, Basal and insulin-stimulated rates of hepatic glucose production during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedures in awake rats; Data are means \pm SEM of four independent experiments, *i.e.* four different cohorts of control rats or DIO rats. DIO or Control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO (+) vs PTP1B-Sense (+).

Fig. 6. Effect of icv PTP1B-ASO on PTPase and PTP1B activities in control and DIO rats. Total PTPase activity and PTPase activities in immunoprecipitates were assayed by incubation with the pp60^{C-src} C-terminal phosphoregulatory peptide (TSTEPQpYQPGENL), as described in *Materials and Methods*. A, Total PTPase activity in hypothalamus; B, PTPase activity in PTP1B immunoprecipitates; C, PTPase activity in IR immunoprecipitate; D, PTPase activity in Jak-2 immunoprecipitates. Data are means \pm SEM of four independent experiments, *i.e.* four different cohorts of control rats or DIO rats. DIO or control rats: *, $P < 0.05$ PTP1B-ASO vs PTP1B-Sense.

Acknowledgments

We thank Mr. Luis Janieri, Mr. Márcio Alves da Cruz, and Mr. Jósimo Pinheiro for their technical assistance.

Figure 1

■ PTP1B-Sense
■ PTP1B-ASO

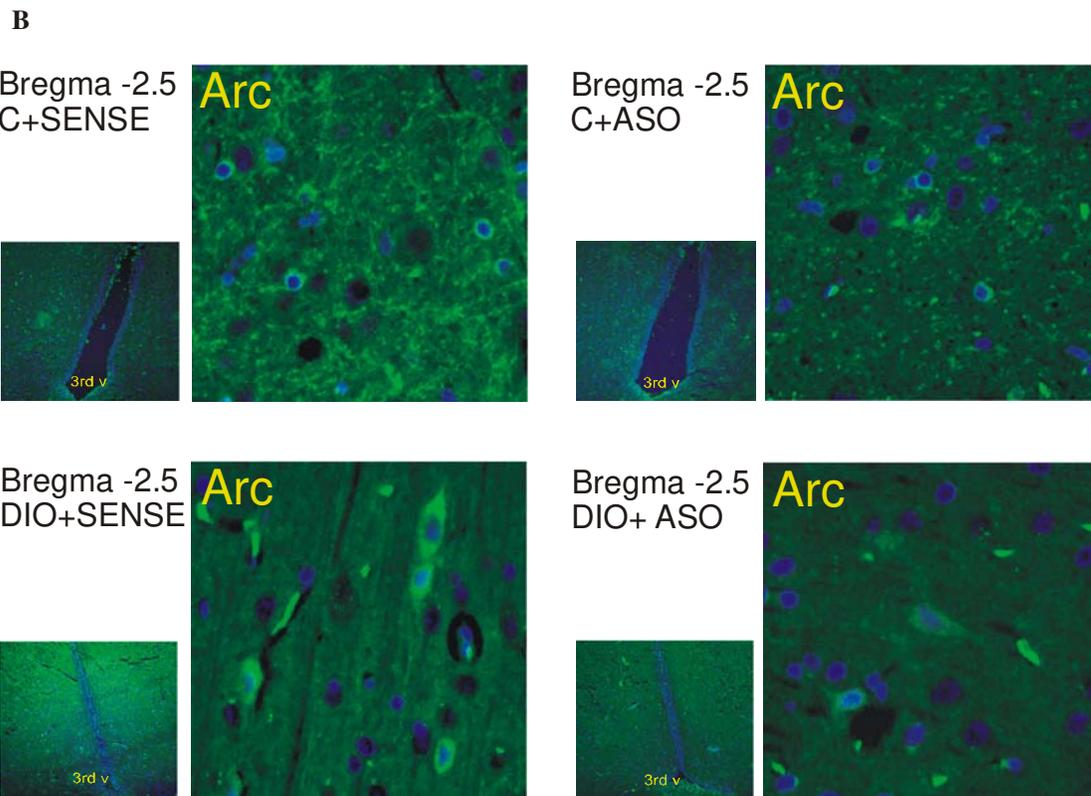
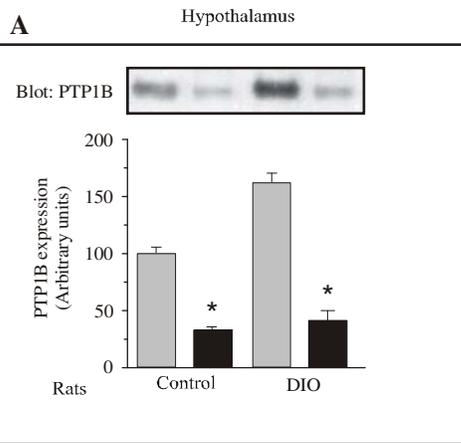
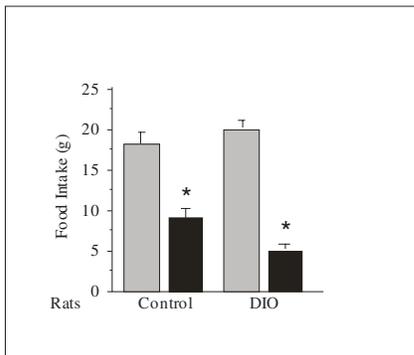


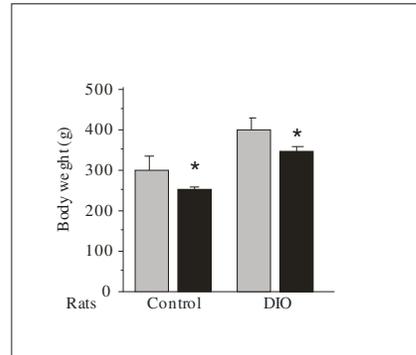
Figure 2

■ PTP1B-Sense
■ PTP1B-ASO

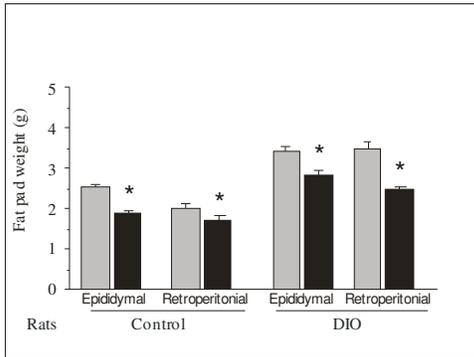
A



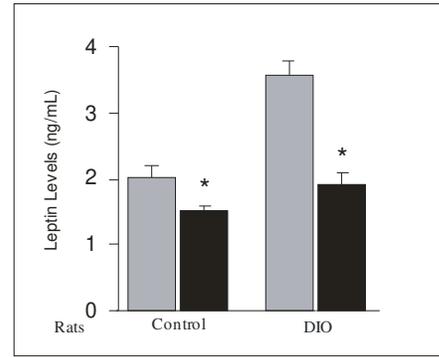
B



C



D



E

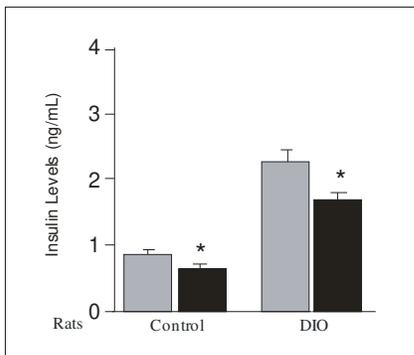
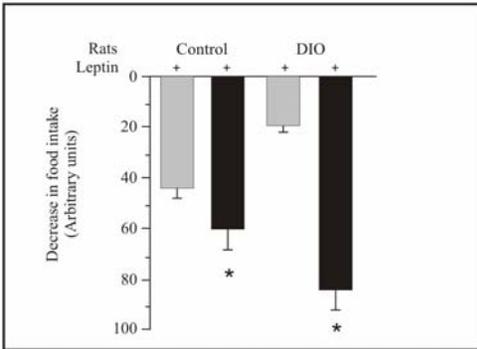


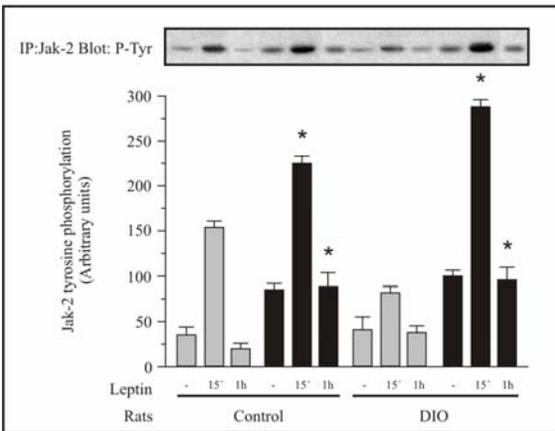
Figure 3

PTP1B-Sense
 PTP1B-ASO

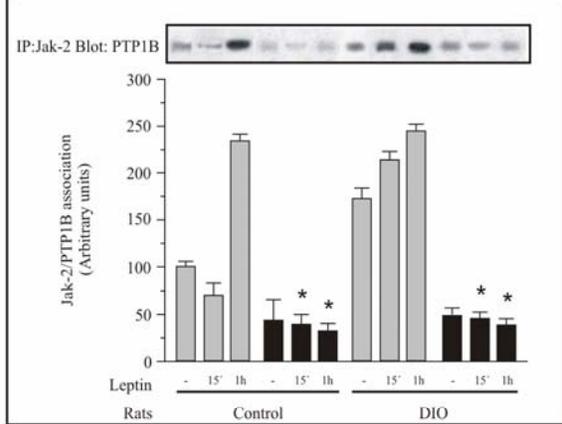
A



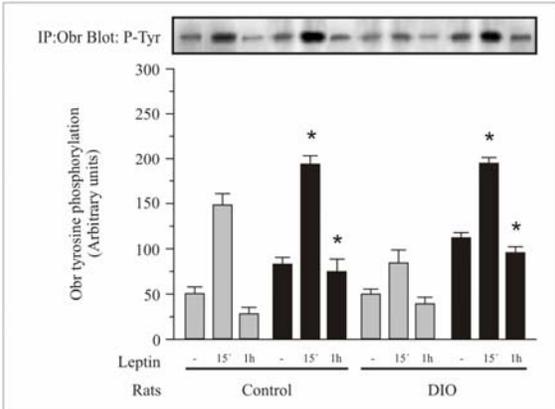
B



C



D



E

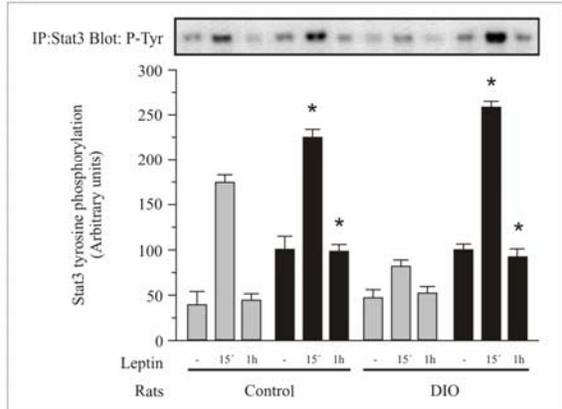
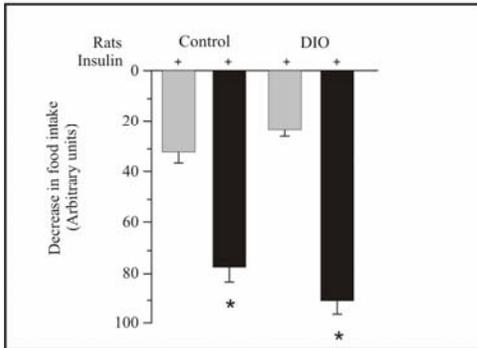


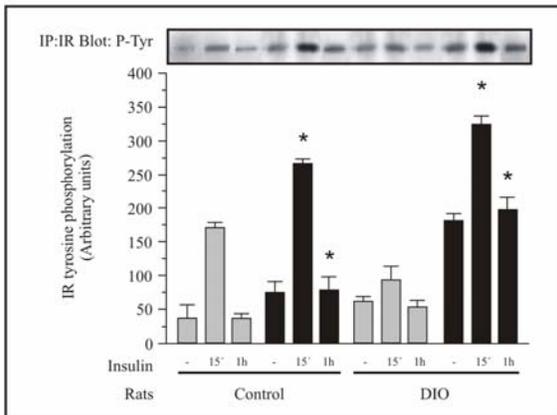
Figure 4

PTP1B-Sense
 PTP1B-ASO

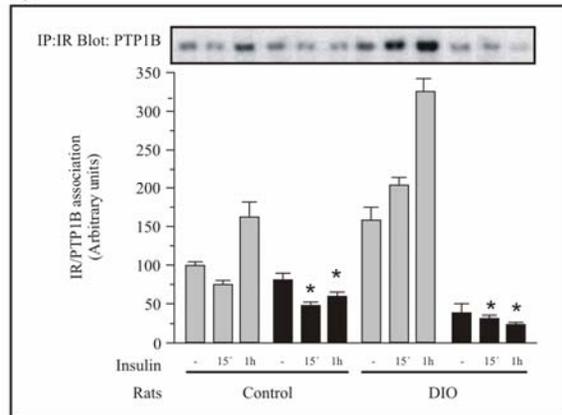
A



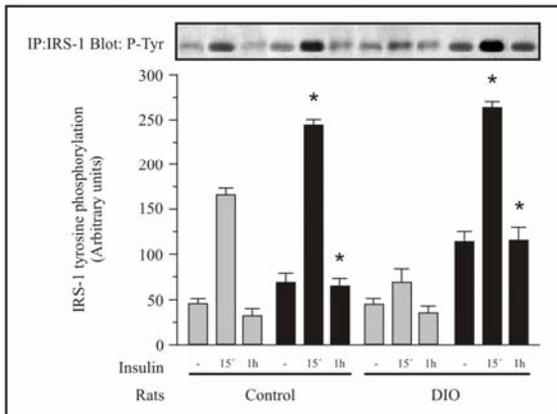
B



C



D



E

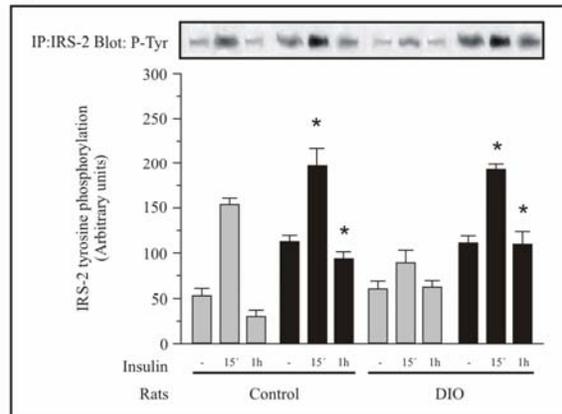
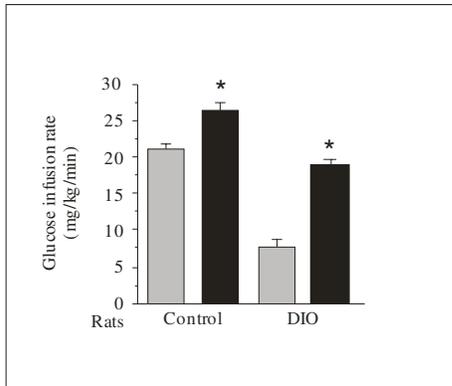


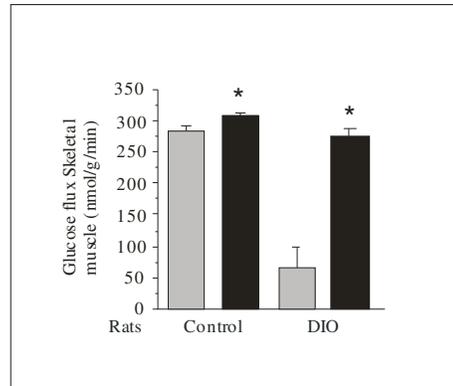
Figure 5

■ PTP1B-Sense
■ PTP1B-ASO

A



B



C

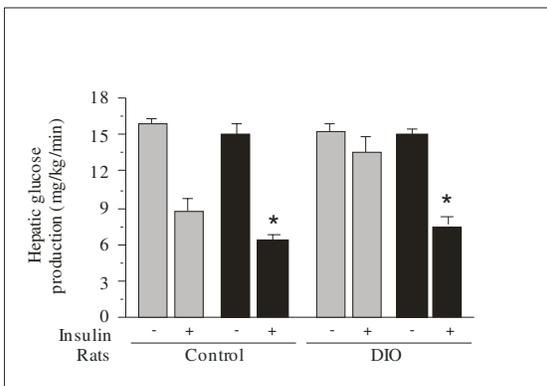
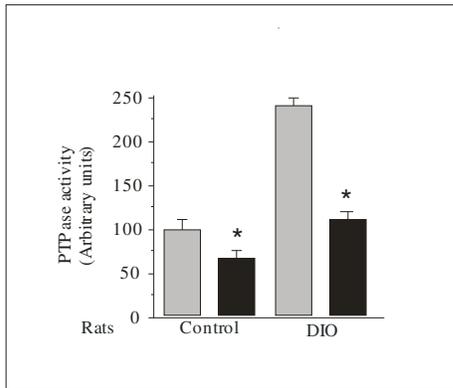


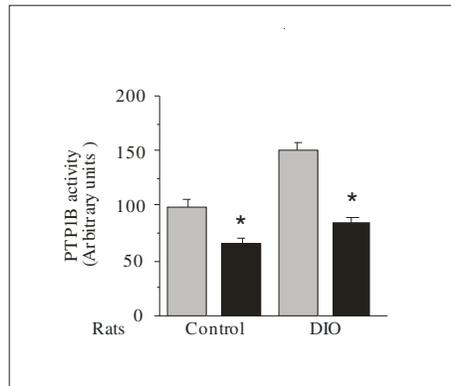
Figure 6

■ PTP1B-Sense
■ PTP1B-ASO

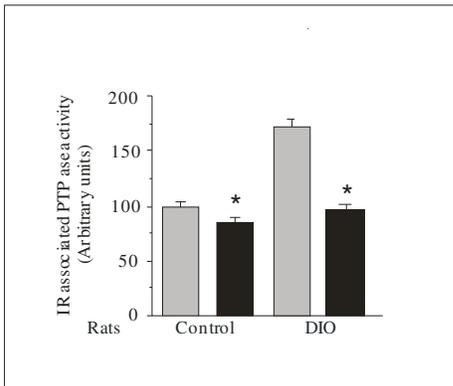
A



B



C



D

