



LAÍS WEISSMANN

**“A SERINA QUINASE IKK EPSILON ( $IKK\epsilon$ ) É IMPORTANTE PARA  
A AÇÃO E SINALIZAÇÃO DA INSULINA E LEPTINA NO  
HIPOTÁLAMO DE CAMUNDONGOS OBESOS”**

**CAMPINAS  
2013**





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

LAÍS WEISSMANN

**“A SERINA QUINASE IKK EPSILON (IKK $\epsilon$ ) É IMPORTANTE PARA  
A AÇÃO E SINALIZAÇÃO DA INSULINA E LEPTINA NO  
HIPOTÁLAMO DE CAMUNDONGOS OBESOS”**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
LAÍS WEISSMANN, E ORIENTADA PELA  
PROF. DR. PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA

---

Assinatura do Orientador

CAMPINAS  
2013

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

W438s Weissmann, Laís, 1989-  
A serina quinase IKK epsilon (IKKe) é importante para a ação e sinalização da insulina e leptina no hipotálamo de camundongos obesos / Laís Weissmann. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Quinase I-kappa B epsilon. 2. Hipotálamo. 3. Insulina. 4. Leptina. 5. Obesidade. I. Prada, Patrícia de Oliveira, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The serine kinase IKK epsilon (IKKe) is important for the action and signaling of insulin and leptin in the hypothalamus of obese mice

**Palavras-chave em inglês:**

I-kappa B Kinase epsilon

Hypothalamus

Insulin

Leptin

Obesity

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestra em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Patrícia de Oliveira Prada [Orientador]

Eduardo Rochete Ropelle

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

**Data de defesa:** 06-08-2013

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

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

LAÍS WEISSMANN

Orientador (a) PROF(A). DR(A). PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA

*Patrícia de Oliveira Prada*

2. PROF(A). DR(A). EDUARDO ROCHETE ROPELLE

*Eduardo Rochete Ropelle*

3. PROF(A). DR(A). CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO

*Carla Roberta de Oliveira Carvalho*

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

Data: 06 de agosto de 2013

# *Dedicatória*

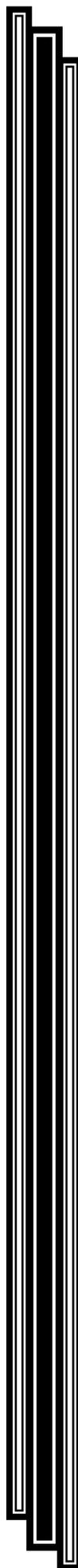
Dedico esta dissertação aos meus pais, que foram meus primeiros mestres,

Ensinando e trilhando os meus passos no caminho certo.

Dedico ainda ao meu noivo Felipe,

Pelo apoio incondicional durante o mestrado

# *Agradecimiento*



- Primeiramente a Deus pela oportunidade de concluir este trabalho, por ser meu guia em momentos difíceis, me dando forças para superar as dificuldades, mostrando o caminho nas horas incertas e suprimindo em todas as minhas necessidades.
- A minha orientadora Professora Dra. Patrícia de Oliveira Prada, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e proporcionar a oportunidade de desenvolver este trabalho.
- Agradeço aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho Dr. Mário Saad, Dr. Jackson, Dra. Iscia, Paula, Andressa, Gisele, Tamires, Carlos, Alexandre, Vinícius, Joelcimar, Lígia, Ramom, Dioze, Luiz e Jósimo.
- Agradeço aos meus pais, Lélío e Joziani, e a toda a minha família pelo carinho, paciência e incentivo, dedicados a mim em todos os momentos.
- Agradeço ao meu noivo, Felipe, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, compreensão, amizade e paciência durante o mestrado.
- Agradeço a toda a minha família, principalmente ao meu avô Lázaro, por toda confiança e apoio.
- Aos amigos que fizeram parte deste momento me ajudando e me incentivando.
- A todos os colegas de laboratório pelo convívio e aprendizado.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do projeto de mestrado (processo nº 2011/02289-2), pelo auxílio financeiro através da bolsa e da reserva técnica.

# *Epígrafe*

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."  
**(Galileu Galilei)**

# *Resumo*

Recentemente, demonstrou-se que I $\kappa$ B quinase e (IKK $\epsilon$ ) aumenta a resistência à insulina (RI) induzida por dieta hiperlipídica em tecido adiposo e hepático. Assim, os objetivos do presente estudo foram investigar: 1) a expressão e ativação de IKK $\epsilon$  no hipotálamo de camundongos DIO e db/db; 2) o papel da IKK $\epsilon$  hipotalâmica no metabolismo energético e da glicose, e na ação e sinalização da insulina e leptina. Observamos maior expressão e ativação de IKK $\epsilon$  no hipotálamo de camundongos db/db e DIO quando comparados aos controles. Cinco dias de injeção intracerebroventricular (ICV) de CAY (inibidor farmacológico da IKK $\epsilon$ ) ou de IKK $\epsilon$  siRNA, via mini-bomba ICV, reduziu 80% da atividade de IKK $\epsilon$ , a fosforilação do IRS1<sup>Ser307</sup> e não alterou a fosforilação de IKK $\alpha/\beta$  em hipotálamo. A inibição IKK $\epsilon$  (ICV): reduziu a adiposidade e ingestão alimentar, aumentou o consumo de O<sub>2</sub> e expressão de UCP-1 no adiposo marrom, melhorou os efeitos anorexigênicos da insulina e de leptina, aumentou a fosforilação do receptor de insulina, da AKT, JAK2 e STAT3 em hipotálamo de camundongos DIO e db/db. Esses resultados persistiram com pair-feeding e pair-weight. A inibição com CAY (ICV) reduziu: a glicemia de jejum, produção hepática de glicose e expressão da PEPCK em fígado de animais DIO e db/db. Em resumo, os dados sugerem que IKK $\epsilon$  hipotalâmica está ativada em modelos de obesidade e participa no desenvolvimento da resistência à insulina e leptina. Sua inibição reduz a adiposidade, ingestão alimentar e aumenta o gasto energético. A IKK $\epsilon$  além de influenciar o metabolismo energético, também tem um papel no metabolismo da glicose de animais obesos. Assim, pode-se sugerir que a IKK $\epsilon$  representa uma ligação entre a obesidade e resistência à insulina e leptina no hipotálamo e pode ser um alvo terapêutico para a resistência à insulina, obesidade e diabetes.

# *Abstract*

It was demonstrated that I $\kappa$ B kinase epsilon (IKK $\epsilon$ ) increased insulin resistance (IR) in liver and adipose tissue of diet-induced obesity (DIO) mice. The aims of this study are to investigate: 1) the expression and activation of IKK $\epsilon$  in the hypothalamus from DIO mice and db/db, 2) the role of hypothalamic IKK $\epsilon$  in the energy and glucose metabolism, and in insulin and leptin action/signaling. We observed increased expression and activation of IKK $\epsilon$  in the hypothalamus from db/db and DIO mice compared with controls. Five days of intracerebroventricular (ICV) injections of CAY (pharmacological inhibitor of IKK $\epsilon$ ) or siRNA, via ICV mini-pump, reduced 80% of IKK $\epsilon$  activity as well as the phosphorylation of IRS1<sup>Ser307</sup> and did not alter the phosphorylation of IKK $\alpha/\beta$  in hypothalamus from obese mice. Inhibition of IKK $\epsilon$  (ICV) reduced fat mass, food intake and increased O<sub>2</sub> consumption and expression of UCP-1 in the brown adipose tissue, improved anorexigenic effects of leptin and insulin, increased insulin receptor, AKT, JAK2 and STAT3 phosphorylation in the hypothalamus of DIO and db/db mice. These results persisted even if in pair-fed and pair-weight mice. Inhibition of IKK $\epsilon$  with ICV CAY reduced: fasting glycemia, hepatic glucose production and the expression of PEPCK in liver of DIO and db/db animals. In summary, the data suggest that hypothalamic IKK $\epsilon$  is activated in models of obesity and participates in the development of insulin and leptin resistance. Its inhibition reduces adiposity, food intake and increases energy expenditure. Hypothalamic IKK $\epsilon$  influences the energy and glucose metabolism in obese mice. Thus, it can be suggested that the IKK $\epsilon$  represents a link between obesity and insulin resistance in the hypothalamus and may be a new therapeutic target to treat insulin resistance, obesity and diabetes.

# *Abreviaturas*

AgRP – *Agouti-related Protein*

CRF - *corticotropin-releasing factor*

DIO – *Diet-induced obesity*

FoxO1 – *Forkhead transcription factor O1*

ICV – *Intracerebroventricular*

IKK $\alpha$  – *I $\kappa$ B kinase  $\alpha$*

IKK $\beta$  - *I $\kappa$ B kinase  $\beta$*

IKK $\gamma$  - *I $\kappa$ B kinase  $\gamma$*

IKK $\epsilon$  - *I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$*

IL1 $\beta$  - *interleucina 1 $\beta$*

IL6 – *interleucina 6*

IR – *Insulin Receptor*

IRS – *Insulin receptor substrates*

JAK2 – *Janus-kinase 2*

MCP1 – *monocyte chemoattractant protein*

NF $\kappa$ B – *nuclear factor $\kappa$ B*

NPY – *Neuropeptide Y*

PI3-q – *Phosphoinositide-3-Phosphate*

POMC – *Proopiomelanocortin*

siRNA – *small interference RNA*

STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription*

TBK1 – *TANK-binding kinase 1*

TLRs – *toll like receptors*

TLR4 – *tool like receptor 4*

TNF $\alpha$  - *tumor necrosis fator alpha*

TRH - *thyrotropin-releasing hormone*

VMH – *Ventromedial hypothalamus*

$\alpha$ MSH -  *$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone*

# *Sumário*

	<b>Página</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>29</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>56</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>62</b>
<b>Referências.....</b>	<b>64</b>

# *Introdução*

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios no tecido adiposo e outros órgãos e está associada com o aumento da mortalidade devido a suas co-morbidades, como *diabetes mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, e alguns tipos de câncer. Portanto, tornou-se imperativo buscar um entendimento de como a obesidade se instala e contribui para o desenvolvimento das doenças associadas [1].

O excesso de adiposidade tem origem poligênica e multifatorial. Especula-se que a principal causa seja o aumento da ingestão alimentar, embora o sedentarismo e os componentes genéticos também tenham participação no seu desenvolvimento [2] [3].

O peso corpóreo é mantido por meio de um equilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético. O hipotálamo e seus núcleos coordenam este equilíbrio através da modulação de sinais metabólicos, hormonais e neurais. A identificação da ação hipotalâmica de nutrientes e hormônios periféricos, como insulina, leptina, dentre outros, tem auxiliado o entendimento dos circuitos neuronais que controlam o balanço energético[4].

Nas últimas décadas a ação da insulina no hipotálamo em relação à regulação da homeostase energética tem sido amplamente estudada[5] [6] [7] [8].

Em condições normais, a após ligar-se ao seu receptor (IR), a insulina promove uma modificação conformacional do receptor, ativando sua sub-unidade  $\beta$  que catalisa a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS), como IRS-1 e IRS-2. A fosforilação de IRSs promove a ligação e ativação da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3q) que ativa a Akt. A Akt ativada fosforila e remove o fator de transcrição FoxO1 do núcleo. A ativação dessas proteínas pela insulina controla o ritmo de disparos neuronais [6], o que é condicionado à ativação de canais de potássio ATP-dependentes. Através do controle do ritmo de disparos neuronais, a insulina modula a liberação de neurotransmissores em sinapses efetoras [7]. Além disso, a fosforilação da FoxO1 induzida por insulina tem sido associada com a redução da expressão dos neuropeptídeos NPY

(*neuropeptide Y*), AgRP (*agouti-related-protein*) e aumento de POMC (*proopimelanocortin*) [9]. Sendo NPY e AgRP orexigênicos e o POMC, através do seu metabólito alfa-MSH ( *$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone*), anorexigênicos. Portanto, o efeito da insulina é induzir anorexia.

Assim como a insulina, o hormônio leptina atua reduzindo ingestão e aumentando a termogênese. Porém diferentemente da insulina, o receptor de leptina (OBR) não possui atividade catalítica intrínseca, sendo constitutivamente ligado a JAK2 que possui atividade tirosina quinase [10]. A ligação da leptina ao seu receptor induz ativação da JAK2 com subsequente fosforilação em tirosina da STAT3 que coordenará a redução da transcrição de NPY e AgRP e aumentará a transcrição de neuropeptídeos dos sistema melanocortina, POMC,  $\alpha$ MSH, TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) e CRF (*corticotropin-releasing factor*) que são anorexigênicos.

A redução da transmissão hipotalâmica do sinal de insulina e leptina em animais de experimentação induz obesidade e pode induzir diabetes tipo 2 [11] [12] [13].

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que a obesidade produz um estado de inflamação crônica subclínica, caracterizado por níveis circulantes elevados de citocinas pro-inflamatórias e infiltração de macrófagos no tecido adiposo [14]. Muitas destas citocinas liberadas bloqueiam a ação da insulina em vários tecidos. Um dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desencadeamento de resistência à insulina é a ativação da via inflamatória IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B [14].

A via inflamatória IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B participa da imunidade inata e é estimulada quando os receptores TLRs (toll like receptors), principalmente TLR4, são ativados por aumento circulante de citocinas ou de produtos de vírus e bactérias, ou ainda por ácidos graxos saturados livres [14].

Classicamente, o complexo IKK compreende duas subunidades catalíticas, as serina-quinases IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , e uma subunidade regulatória conhecida como

NEMO (NF $\kappa$ B essencial modulador) ou IKK $\gamma$ . A ativação do complexo IKK é mediada pela oligomerização de IKK $\gamma$  e interação com moléculas adaptadoras, levando a subsequente fosforilação das serina-quinases IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ . Uma vez fosforiladas, as IKKs controlam a degradação, na via proteassômica, de I $\kappa$ B por regularem sua fosforilação em serina 32 e 36.

Como o I $\kappa$ B no citoplasma está ligado ao NF $\kappa$ B, sua degradação induz a liberação do NF $\kappa$ B para o núcleo celular. No núcleo, o NF $\kappa$ B atua como fator de transcrição, liga-se ao DNA e regula diversos processos celulares, incluindo sobrevivência celular, proliferação e diferenciação celulares, além de aumentar a resposta imune e inflamatória [15]. Neste sentido, aumenta a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória como, por exemplo, o TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), IL-1 $\beta$  (interleucina 1 $\beta$ ), IL-6 (interleucina 6), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) e das próprias IKKs [15].

Dentre as IKKs clássicas, IKK alfa e beta, NF $\kappa$ B também aumenta a expressão de outra isoforma de IKK, a IKK $\epsilon$  (quinase do inibidor do fator nuclear  $\kappa$ B epsilon). A IKK $\epsilon$ , portanto, é chamada de induzível, pois aumenta a partir da ativação do NF $\kappa$ B. Esta isoforma também participa da fosforilação e degradação do I $\kappa$ B [15] [16].

A IKK $\epsilon$  tem 30% de homologia com IKK $\beta$  no domínio N-terminal e similar arranjo estrutural no domínio C-terminal e pode ser induzida por processos inflamatórios. Inicialmente foi identificada em macrófagos, leucócitos e tecidos do sistema imune como timo e baço. Sua expressão está elevada em pacientes com doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide e osteoartrite [17].

A conexão entre ativação da via IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B e resistência à insulina ocorre devido as IKKs serem serinas-quinases que quando ativadas podem promover a fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina, os IRSs. Este evento bloqueia o sinal da insulina e constitui um dos elementos mais

significativos indutores de resistência à insulina desencadeada por obesidade em diversos tecidos [14].

Neste contexto, a IKK $\beta$  foi descrita como um importante alvo para terapia anti-inflamatória na obesidade associada ao diabetes tipo 2. Vários estudos demonstraram que na presença de obesidade e inflamação crônica subclínica o bloqueio farmacológico com ácido acetilsalicílico ou a deleção genética de IKK $\beta$  melhorava o metabolismo da glicose em tecidos periféricos de animais de experimentação [18, 19].

Mais recentemente demonstrou-se que a expressão e atividade de IKK $\epsilon$  em tecidos hepático e adiposo estavam mais elevadas em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Em paralelo, demonstrou-se que os animais *knockouts* para IKK $\epsilon$  são protegidos do desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina quando submetidos à dieta hipercalórica, sugerindo um papel importante da IKK $\epsilon$  em mediar resistência à insulina ligada à obesidade. Adicionalmente, os animais *knockouts* para IKK $\epsilon$  apresentaram diversas alterações no metabolismo energético que resultaram em redução de peso corpóreo [20]. Entretanto, o papel da IKK $\epsilon$  especificamente no hipotálamo como controlador do balanço energético ainda não foi investigado.

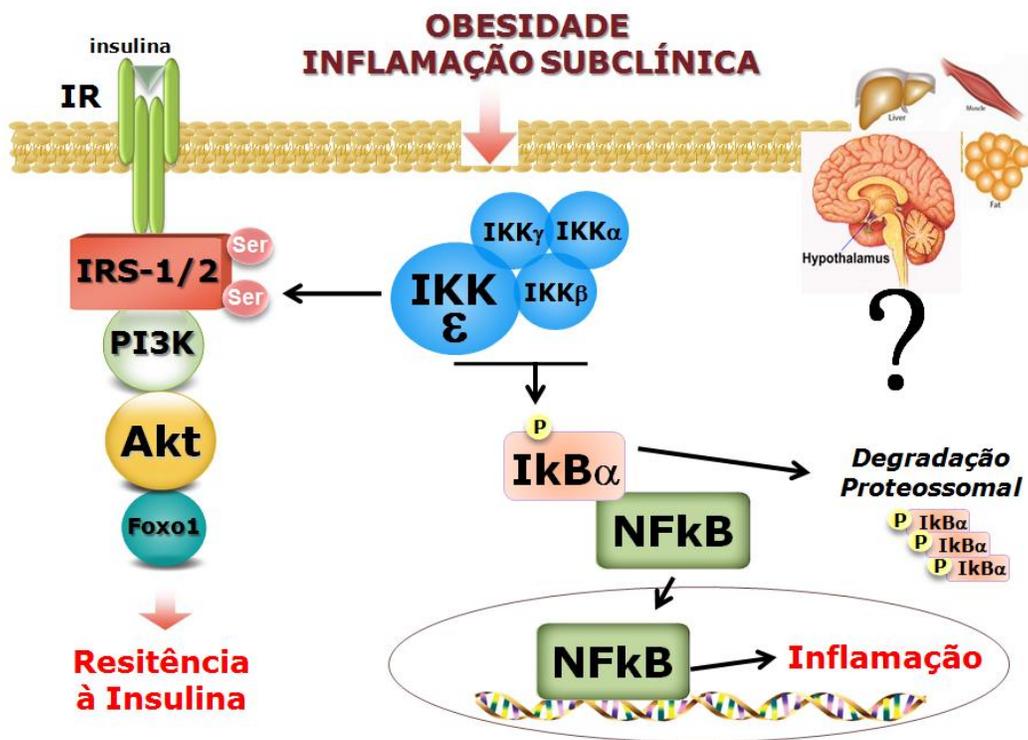
Assim como ocorre em tecidos periféricos, demonstrou-se que a via IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B estava ativada em hipotálamo de animais obesos e que este fenômeno gerava resistência hipotalâmica aos efeitos anorexigênicos de insulina e leptina [21]. Dessa forma, fazendo uma analogia com os estudos com IKK $\epsilon$  pode-se conjecturar que a esta serina-quinase pode ser uma proteína chave da via inflamatória indutora de resistência à insulina também em hipotálamo de animais obesos.

Nesse sentido, o **primeiro objetivo** desse estudo é investigar os níveis e grau de fosforilação de IKK $\epsilon$  em hipotálamo de camundongos obesos. Esta investigação foi feita utilizando os métodos de *immunoblotting* e imunohistoquímica.

O **segundo objetivo** do estudo é investigar se a inibição da expressão de IKK $\epsilon$  (com inibidor farmacológico CAY10576 ou siRNA) especificamente no hipotálamo de animais obesos modula a ingestão alimentar e o gasto energético.

E o **terceiro objetivo** do estudo é investigar se a inibição da expressão de IKK $\epsilon$  especificamente no hipotálamo de animais obesos, com inibidor farmacológico ou siRNA, altera a sensibilidade hipotalâmica à insulina e leptina, e também a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos ligados a modulação do balanço energético como NPY e POMC.

Adicionalmente, investigar, no **quarto objetivo**, se a inibição da IKK $\epsilon$  com CAY em hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta e db/db altera o metabolismo hepático de glicose.



# *Objetivos*

1. Investigar se a obesidade por dieta hiperlipídica ou genética altera a expressão de IKK $\epsilon$  em hipotálamo, através dos métodos de *immunoblotting* e imunohistoquímica.
2. Investigar se a inibição da expressão de IKK $\epsilon$  por inibidor farmacológico CAY ou siRNA no hipotálamo modula a ingestão alimentar e o gasto energético de animais obesos.
3. Investigar se a inibição da expressão de IKK $\epsilon$  altera a sensibilidade hipotalâmica à insulina e leptina em animais obesos.
4. Investigar se a inibição da expressão de IKK $\epsilon$  no hipotálamo modula a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos ligados a modulação do balanço energético (NPY e POMC) de animais obesos.
5. Investigar se a inibição da IKK $\epsilon$  com CAY em hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta e db/db altera o metabolismo hepático de glicose.

# *Materias e Métodos*

## **ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos C57BL/6/J, machos e com 8 semanas de idade (20-30g de peso corpóreo), fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os camundongos foram acondicionados em novo ambiente mantido a 25°C, com ciclos claro-escuro fixos (12/12 horas), recebendo água potável e dieta padrão *ad libitum* por 1-2 semanas para adaptação ao novo local. Foram acondicionados em gaiolas plásticas, contendo 4 camundongos/gaiola e após 1 semana de adaptação, um grupo de animais continuou recebendo dieta padrão (Nuvilab com 70% de carboidrato, 20% de proteína e 10% de gordura) e outro grupo recebeu dieta hiperlipídica (consistindo de 55% das calorias oriundas de gordura saturada (banha de porco), 29% de carboidratos e 16% de proteínas) durante 2 meses ou 8 semanas [22]. Foram estudados de aproximadamente 20 animais, para cada experimento, em cada dieta.

## **CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA**

### **Medida da Glicemia em Jejum**

Antes e ao final da administração de dieta hiperlipídica, os animais ficaram em jejum de 12 horas e a glicemia foi verificada. O sangue foi coletado da ponta da cauda dos animais e uma alíquota de 20 microlitros foi destinada a medida da glicemia através de fitas reativas medidas em glicosímetro.

### **Teste de Tolerância à Insulina (ITT)**

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado após jejum de 6 horas para avaliar a sensibilidade periférica à insulina no animal intacto após a administração de dieta hiperlipídica. Foi administrada insulina regular (1,5U/kg, intraperitoneal) e o sangue foi coletado pela ponta da cauda nos tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

## **CANULAÇÃO DE VENTRÍCULO LATERAL PARA CAMUNDONGOS POR ESTEREOTAXIA**

Camundongos C57BL6/J machos foram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma mistura de hidrocloreto de quetamina e diazepam (70:30) (50 mg/kg, intraperitoneal) e posicionados sob o aparelho estereotáxico para implante de cânula no ventrículo lateral direito, seguindo as coordenadas obtidas no Atlas Paxinos-Watson. Após a fixação da cabeça do animal foi feita uma incisão, o periósteo será aberto expondo a sutura sagital. O bregma foi usado como ponto de referência e um orifício foi perfurado no osso parietal na junção das coordenadas: lateral e anteroposterior. A cânula foi posicionada no orifício central e rebaixada cuidadosamente até que a coordenada dorsoventral seja alcançada. A cânula foi fixada no crânio usando uma resina. Após a secagem da resina o animal foi retirado do aparelho e permaneceu de 6-7 dias se recuperando do procedimento cirúrgico. A confirmação da posição das cânulas foi feita através da injeção ICV de angiotensina II, que induz efeito dipsinogênico [23].

## **INIBIÇÃO DA IKK $\epsilon$**

Para inibição da IKK $\epsilon$  foi utilizado o inibidor farmacológico CAY 10576 (Cayman chemical). Os animais, após canulação e teste de angiotensina II, foram tratados, através de injeções ICV, 2 vezes ao dia, durante 5 dias com o inibidor CAY, e neste período foi realizado os testes fisiológicos.

Para outra forma de inibição, utilizamos o RNA de interferência da IKK $\epsilon$  (siRNA) (Sigma – Aldrich).

RNA sense: 5' [Phos] rCrCrGrGrCrArGrArArGrGrUrGrCrUrArArUrCrArU 3'

RNA antisense: 5' [Phos] rGrArUrUrArGrCrArCrCrUrUrCrUrGrCrCrGrGrCrU 3'

Os animais foram canulados com mini bomba (mini-pump alzet) havendo então infusão direta do siRNA no terceiro ventrículo desses animais. Foram tratados por 5 dias, e neste período foi realizado os testes fisiológicos.

## CONSUMO DE OXIGÊNIO

Consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono e determinação da média de trocas gasosas, ambos foram mensurados em animais alimentados através de um circuito aberto indireto calorimétrico (Oxymax Deluxe System; Columbus Instruments, Columbus, OH), como descrito previamente [24]. O tempo de avaliação desses animais foram de 48 horas, sendo 24 horas de adaptação e mais 24 horas de mensuração do gasto energético.

## TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO

O teste de tolerância ao piruvato foi realizado após jejum *overnight* dos animais. Uma injeção intraperitoneal de piruvato dissolvido em solução salina (0,9%) será aplicada nos animais na dose de 2 g/Kg de peso corporal.

A glicemia foi verificada coletando-se sangue caudal, através de fitas reativas e glicosímetro nos tempos: 0 (basal) 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de piruvato.

## IMUNO-HISTOQUÍMICA

Camundongos C57BL/6J foram anestesiados com ketamina e diazepam e perfundidos (transcardíaca) com salina 0,9% seguido por formalina a 10%. Os cérebros foram removidos, imersos em formalina por 3-4h e subsequentemente em 20% de sacarose por 18-36h a 4°C. Os cérebros foram seccionados coronalmente na espessura de 35 µm, utilizando micrótomo. Os cortes foram coletados em 5 séries iguais e estocados à -20°C.

IHC foi realizada utilizando as séries cortadas de cérebro. Em resumo, as séries foram incubadas com 0,3% de peróxido de hidrogênio para inibir a atividade de peroxidase endógena. Após incubação com solução bloqueadora por 2 horas, as séries foram incubadas por 10-12h com anticorpo anti- IKKε (IKKε (D20G4) Rabbit mAb – cell signaling) (1:500 e 1:1000). A ligação do anticorpo foi detectada usando anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories) e kit ABC (Vectastain Elite, Vetor Laboratories) e *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*

(DAB). A especificidade do anticorpo foi confirmada usando um controle negativo onde o anticorpo primário foi omitido. As séries foram montadas em lâminas (Superfrost Plus, Fisher Scientific), desidratadas com álcool e subsequentemente avaliadas em microscópio.

## **EXTRAÇÃO de RNA e QPCR**

A extração do mRNA foi feita segundo protocolo do Trizol™. Para verificar a integridade do RNA, foi feito um gel de agarose 1,0%. Após a verificação da integridade, as amostras de mRNA foram transformadas em cDNA em uma concentração final de 3,0µg.

### **PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR**

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizados primers para amplificação dos genes NPY e POMC. O gene *18S* (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *18S* está marcada com o fluoróforo VIC, enquanto que os outros primers supracitados estão marcados com o fluoróforo FAM.

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems).

## **EXTRAÇÃO DE TECIDOS**

Após as medidas de ingestão alimentar, peso, consumo de O<sub>2</sub>, teste do piruvato e/ou imuno-histoquímica, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi extraído os seguintes tecidos: hipotálamo, tecido adiposo marrom (BAT), fígado e baço. Os adiposos foram extraídos e pesados para avaliação da massa adiposa. Após a extração, os tecidos foram homogeneizados em tampão de extração, e a avaliação da quantidade de proteína foi realizada através de do teste de Biureto e leitura no espectrofotômetro. Após a determinação da quantidade protéica, as amostras foram preparadas com tampão de Laemmli para serem aplicadas no gel de poliacrilamida.

## **IMMUNOBLOTTING**

O immunoblotting foi realizado para determinar a expressão das proteínas envolvidas na sinalização de insulina, leptina e da via inflamatória.

Em resumo, a partir do extrato total de proteínas, 35µg de proteínas por amostra foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. Em todos os casos, o gel de poliacrilamida foi balizado por marcador de peso molecular conhecido (BioRad). Eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com tampão de corrida. O SDS-PAGE foi submetido a 30 volts por 30 minutos e depois a 120 volts por mais 2 horas. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio Rad, com tampão de transferência, mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas.

Após a transferência as membranas foram incubadas em solução bloqueadora por duas horas à temperatura ambiente e lavadas com solução basal por três sessões de dez minutos. Em seguida, incubadas com anticorpo primário específico, lavadas novamente com solução basal e então incubadas com anticorpo secundário e reveladas através de ECL em filme de raio X (Kodak XAR-Rochester, NY).

Após a revelação das auto-radiografias e visualização das bandas, estas foram submetidas à densitometria óptica, utilizando o equipamento Eagle Eye

Scanner (Stratagene). Com estes dados foi realizada análise estatística comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos.

As soluções que foram utilizadas:

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

Tampão de Laemmli (5X): foi utilizado para estocar o material extraído e para posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese de sódio duodecil-sulfato (SDS-PAGE) a 6%. Contendo: azul de bromofenol a 0,1%, fosfato de sódio a 1M pH 7,0, glicerol a 50%, SDS a 10%.

Tampão de corrida (utilizado na eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE): contendo: trisma base a 200 mM, glicina a 1,52 M, EDTA a 7,18 mM, SDS a 0,4%. Foi feita solução estoque que será diluída a 1:4 para uso.

Tampão para transferência: utilizado para transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contendo: trisma base a 25 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20% e SDS a 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contendo: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, Tween 20 a 0,02%.

Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém 5% de leite em pó desnatado (Molico® Nestlé) e azida sódica a 0,02%, dissolvidos em solução basal.

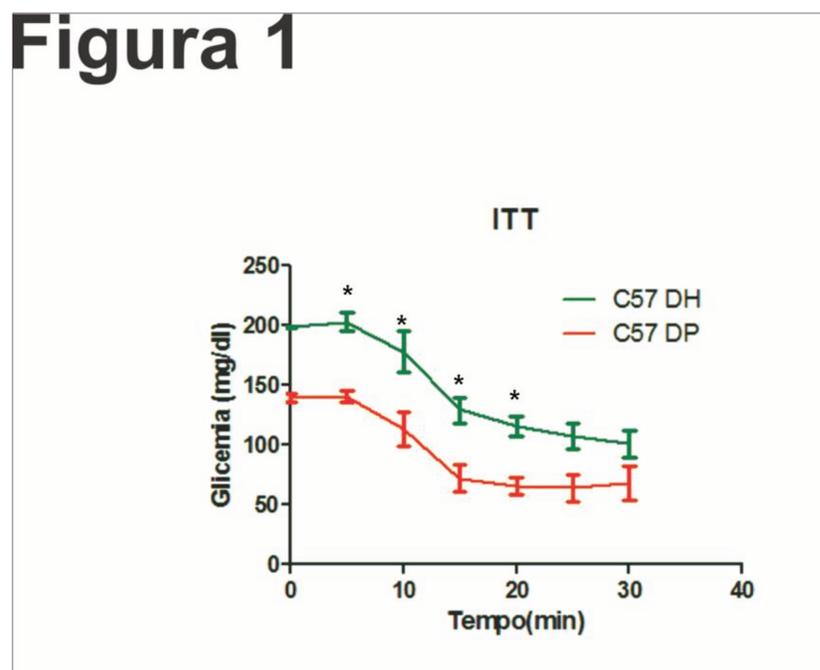
Solução para anticorpos: solução na qual se diluem os anticorpos específicos. Contendo 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica a 0,02%, diluídos em solução basal.

## **FORMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS**

Todos os valores estão expressos como média  $\pm$  erro ou desvio padrão da média. Os dados foram avaliados por análise de variância (One-way ANOVA) seguido por teste de significância (Bonferroni test), comparando grupos experimentais. Erro  $\alpha$  menor do que 5% foi aceito para rejeitar a hipótese de nulidade.

# *Resultados*

Podemos observar na curva do ITT (**Fig. 1**) que os animais submetidos à dieta hiperlipídica demonstram uma maior glicemia basal e um menor decréscimo da glicemia após injeção de insulina quando comparados aos animais controles, sugerindo que os animais obesos podem estar apresentando um quadro de resistência à insulina.



**Figura 1: Caracterização dos animais quanto à sensibilidade à insulina.**

A) Curva do Teste de tolerância a insulina (ITT) em camundongos C57BL6/J submetidos à dieta hiperlipídica (DH) n=10 e dieta padrão (DP) n=10. Resultados apresentados como média±erro padrão da média. \*p<0.05 vs C57BL/6J com DP

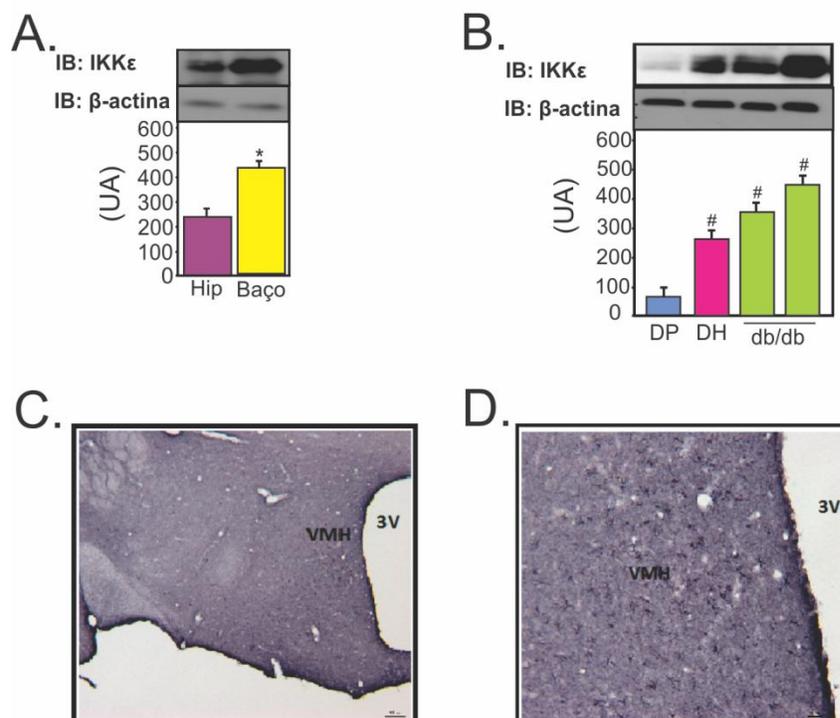
A partir do ITT, utilizamos, na maior parte dos experimentos, os animais obesos e com resistência à insulina.

A figura 2A indica a expressão da IKKε em hipotálamo e baço de animais obesos. Utilizamos o baço como controle positivo no gel.

Podemos observar que IKKε é expressa no hipotálamo de camundongos controles (**Fig. 2 A**) e que está aumentada em camundongos com obesidade

induzida por dieta e em camundongos db/db (**Fig. 2 B**). Também se observa a expressão da proteína IKK $\epsilon$  no núcleo ventro-medial hipotalâmico (VMH) através da técnica de Imuno-histoquímica (**Fig. 2 C-D**). As imagens sugerem a expressão proteica de IKK $\epsilon$  nas células da glia.

## Figura 2



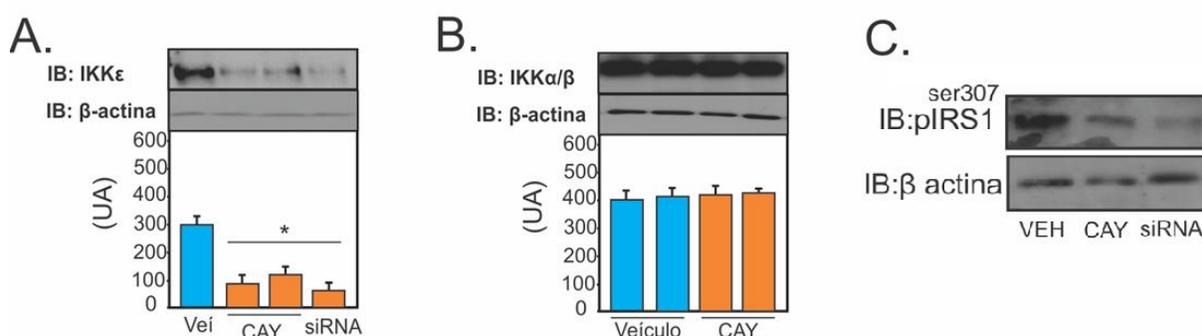
**Figura 2: Expressão proteica da IKK $\epsilon$  em hipotálamo.**

A) Expressão da proteína IKK $\epsilon$  no hipotálamo e no baço de camundongos com obesidade induzida por dieta. B) Expressão da proteína IKK $\epsilon$  em camundongos em dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e db/db. C) Expressão da proteína IKK $\epsilon$  em camundongos pelo método de imuno-histoquímica, visualização em aumento de 10x. (C) e de D) 20x (D). Foram utilizados 2 animais para a imuno-histoquímica. A e B os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média  
\* $p < 0.05$  Baço vs hipotálamo # $< 0.05$  DP vs outros grupos.

Com o objetivo de investigar se a IKK $\epsilon$  tem um papel no metabolismo energético, inibimos a expressão da proteína com inibidor farmacológico ou

siRNA. A administração intracerebroventricular do inibidor farmacológico (CAY10576) e também do siRNA por 5 dias reduziu a expressão de IKK $\epsilon$  no hipotálamo (**Fig. 3-A**) e não alterou a expressão de IKK $\alpha/\beta$ , demonstrando assim que o inibidor farmacológico foi específico para a IKK $\epsilon$  (**Fig. 3-B**). No entanto, a inibição de IKK $\epsilon$  com CAY reduziu a fosforilação em serina 307 do IRS1 em hipotálamo (**Fig 3-C**), mostrando assim que provavelmente a via da insulina não estará mais sendo inibida pois o substrato 1 do receptor de insulina não está sendo mais fosforilado em serina. Em conjunto, estes resultados sugerem que a inibição específica de IKK $\epsilon$  com CAY pode alterar via de sinalização de insulina, melhorando a sensibilidade a este hormônio.

## Figura 3



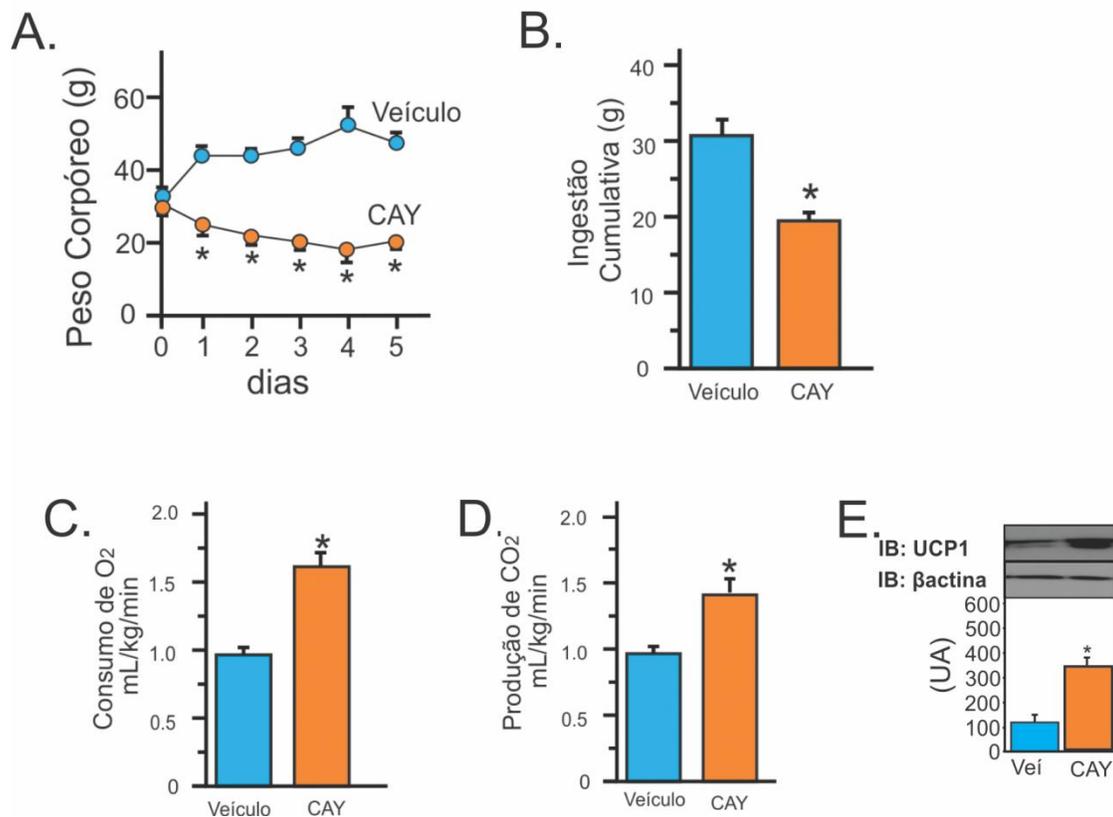
**Figura 3: Eficácia do Inibidor farmacológico (CAY10576) e siRNA.**

A) Expressão da proteína IKK $\epsilon$  no hipotálamo de camundongos tratados intracerebroventricular (ICV) com veículo ou com inibidor farmacológico CAY10576 (CAY) ou siRNA. B) Fosforilação das proteína IKK $\alpha/\beta$  em hipotálamo de camundongos tratados ICV com veículo e CAY. C) Fosforilação em serina 307 do IRS-1 em camundongos tratados ICV com veículo, CAY ou siRNA. Em A e B os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Com a inibição da IKK $\epsilon$  no hipotálamo foi demonstrado uma significativa redução do peso corpóreo e da ingestão alimentar (**Fig. 4-A; B**). A inibição da IKK $\epsilon$  aumentou o consumo de O<sub>2</sub>, a produção de CO<sub>2</sub> e a expressão da UCP1 no tecido

adiposo marrom (BAT) em camundongos obesos induzidos por dieta (**Fig 4-C; D; E**). Esses resultados sugerem que a IKK $\epsilon$  hipotalâmica pode regular o peso corporal, pelo menos em parte, através da modulação da ingestão de alimentar e do gasto energético.

## Figura 4

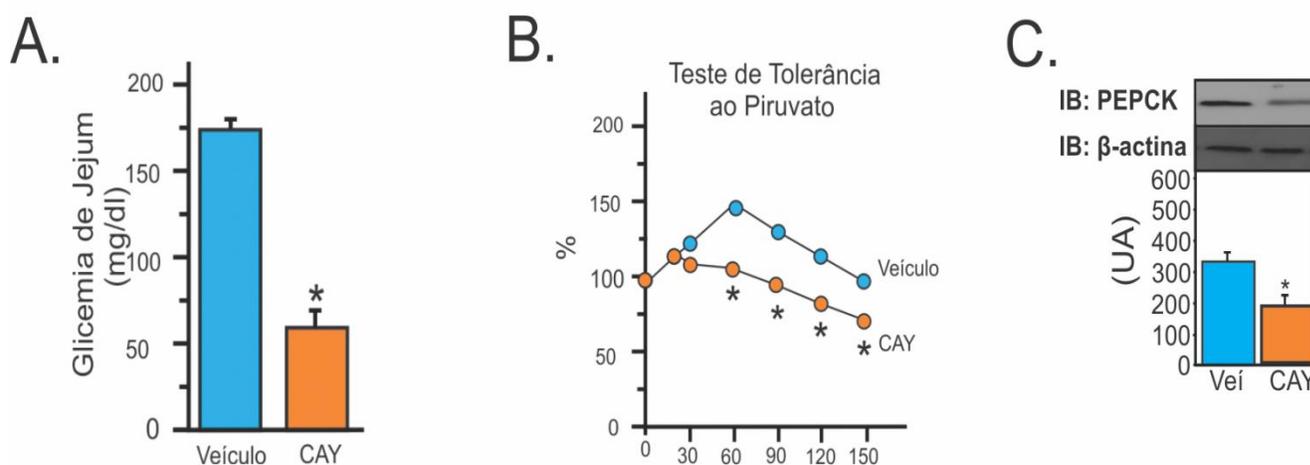


**Figura 4: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica altera o metabolismo energético de animais obesos**

Camundongos tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram seu (A) peso corpóreo (B) Ingestão (C) Consumo de Oxigênio.(D) Produção de gás carbônico e (E) Expressão da proteína UCP-1 em BAT (tecido adiposo marrom) medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média.  $p < 0.05$  vs. veículo

A inibição da IKK $\epsilon$ , por CAY, no hipotálamo diminuiu a glicemia de jejum em camundongos com obesidade induzida por dieta (**Fig 5-A**). A glicemia durante o teste do piruvato foi menor nos animais com IKK $\epsilon$  inibida, sugerindo uma redução na produção hepática de glicose (**Fig 5-B**). Estes resultados foram associados com uma reduzida expressão proteica de PEPCK no fígado (**Fig 5-C**). Em conjunto, estes dados sugerem que a IKK $\epsilon$  além de influenciar o metabolismo energético também pode alterar o metabolismo da glicose.

## Figura 5



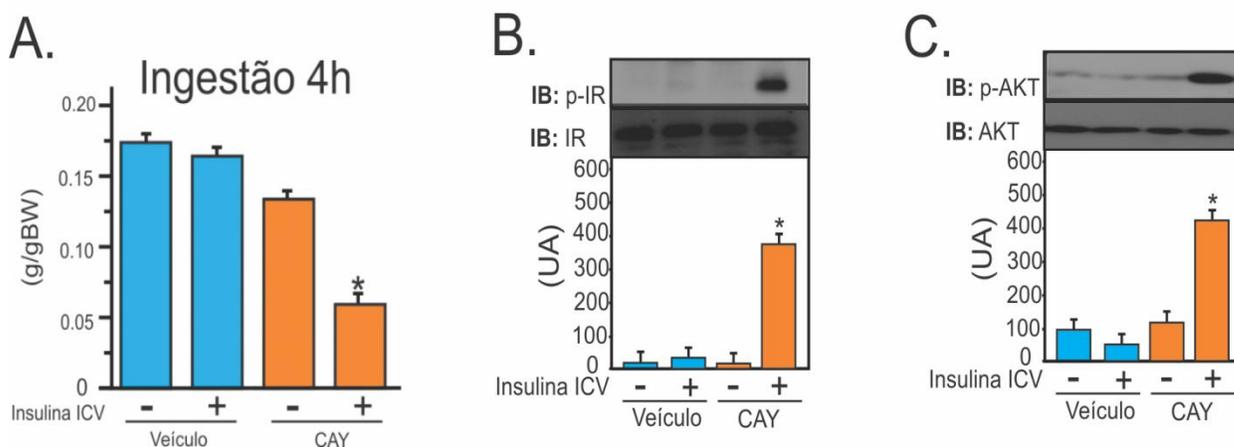
**Figura 5: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica altera o metabolismo da glicose hepática**

Camundongos tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram sua (A) glicemia de jejum (B) tolerância ao piruvato (C) e expressão da proteína PEPCK medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Em A e B os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

O consumo alimentar em resposta à insulina foi menor após 4 horas nos camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig. 6 A**). Nestes mesmos grupos foi observado um aumento da fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina como o IR (receptor de insulina) e AKT no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig. 6- B; C**). Este resultado sugere que a IKK $\epsilon$  pode

ter um papel importante na regulação da sensibilidade hipotalâmica à insulina de camundongos com obesidade induzida por dieta, pois com sua inibição, provavelmente, a fosforilação do IRS1 em serina estava diminuída, fazendo com que a via de sinalização de insulina funcione normalmente.

## Figura 6

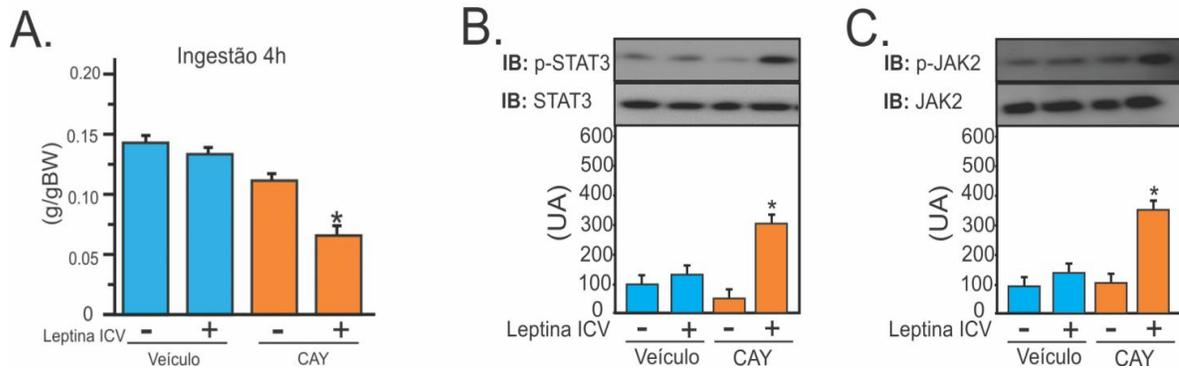


**Figura 6: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora a ação e sinalização da insulina**

Camundongos tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram sua (A) ingestão alimentar após 4h de injeção ICV de insulina (B). Fosforilação do receptor IR (C) e da proteína AKT medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

O consumo alimentar em resposta à leptina foi menor após 4 horas nos camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig. 7 A**). Nestes mesmos grupos foi observado um aumento da fosforilação das proteínas JAK2 e STAT3 no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig. 7 B;C**) Sugerindo que a IKK $\epsilon$  pode ter um papel importante na regulação da sensibilidade hipotalâmica à leptina de camundongos com obesidade induzida por dieta, pois da mesma forma que a insulina, acredita-se que a via de inflamação e mais precisamente a IKK $\epsilon$  possa controlar a sinalização da via da leptina.

# Figura 7



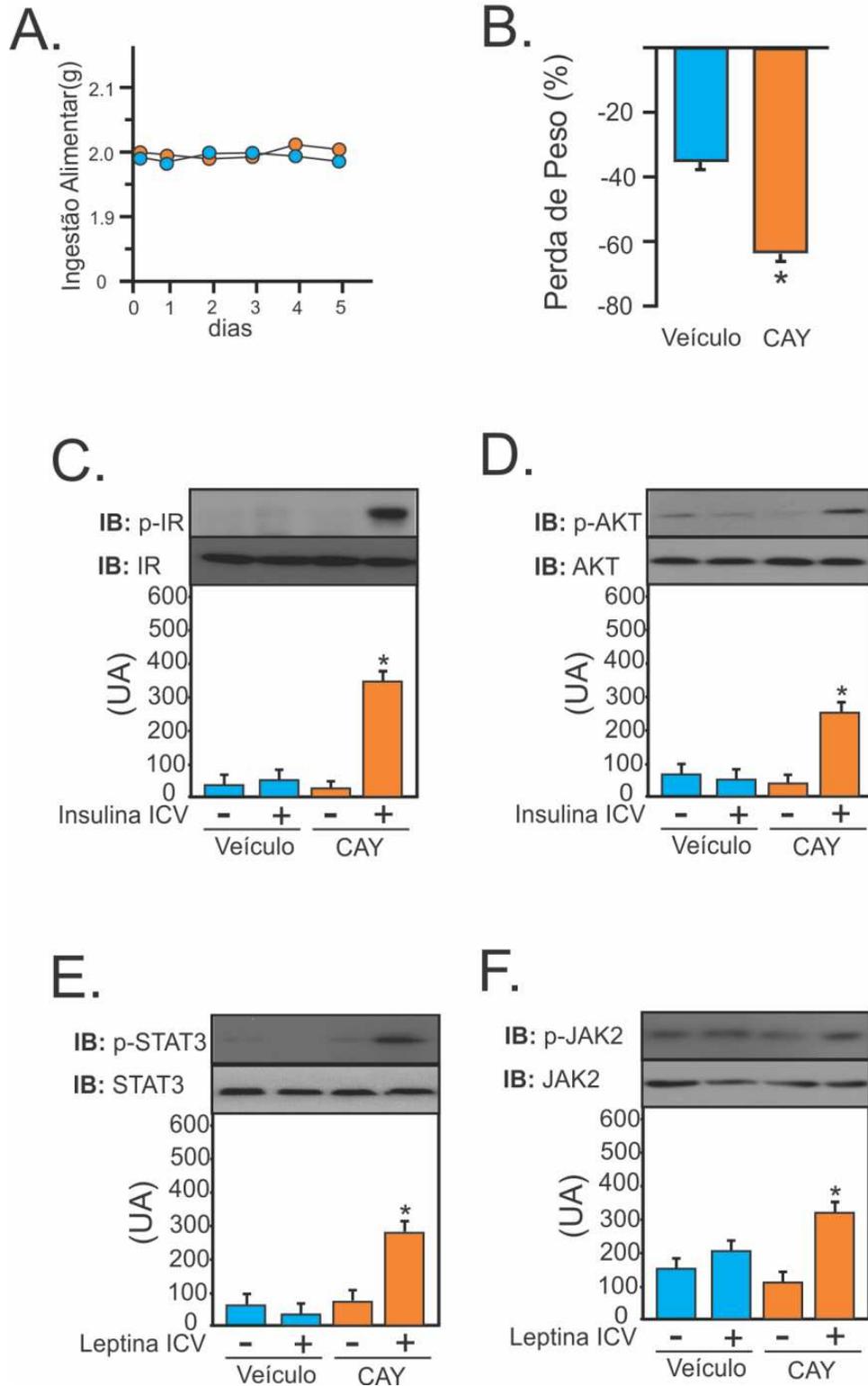
**Figura 7: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora a ação e sinalização da leptina**

Camundongos tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram sua (A) ingestão alimentar após 4h de injeção ICV de leptina (B). Fosforilação da proteína JAK2(C) e da proteína STAT3 medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Para avaliar se a melhora na sinalização de insulina e leptina no hipotálamo foram apenas pelo tratamento com CAY, ou seja, apenas pela inibição da IKK $\epsilon$ , foi realizado o experimento pair-feeding, que consiste em igualar a ingestão alimentar, para isso administrou-se 2g/dia de dieta hiperlipídica (**Fig 8 A**). Mesmo com a mesma ingestão alimentar os animais que foram tratados com CAY foi demonstrado uma significativa perda de peso em comparação com os animais administrados com veículo (**Fig 8 B**). Foi demonstrado um aumento da fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina como o IR e AKT no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig 8 C-D**). Assim como, também foi demonstrado um aumento da fosforilação das proteínas JAK2 e STAT3, pertencentes à via de sinalização de leptina, no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig 8 E-F**). Sugerindo assim, que o aumento na fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina e leptina não foi

influenciada pela diminuição da ingestão alimentar dos animais tratados com CAY.  
Porém, pode ter sido influenciada pela perda de peso.

# Figura 8



**Figura 8: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora a ação e sinalização da insulina e leptina em animais submetidos ao pair-feeding**

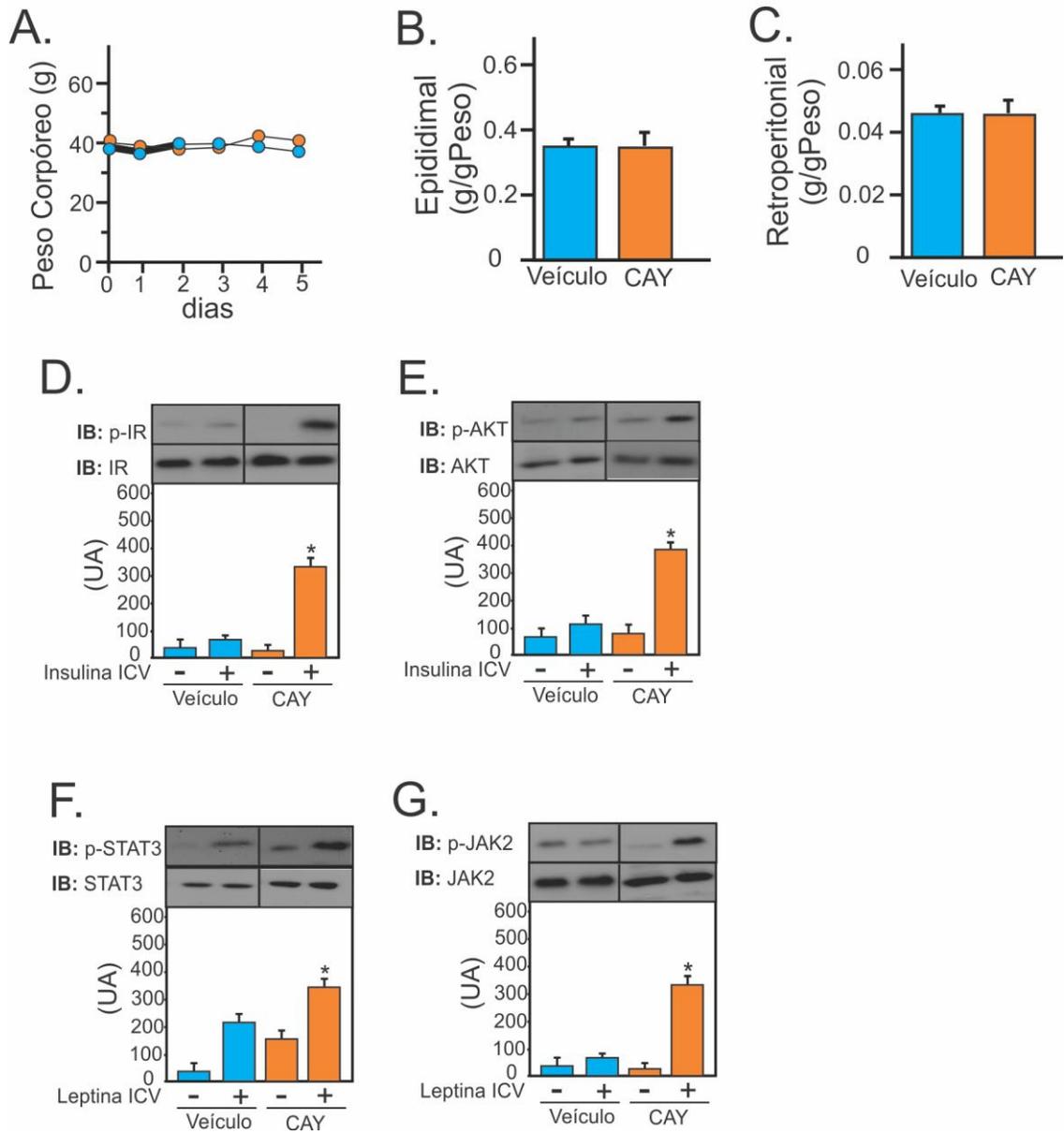
Camundongos tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram seu (A) Ingestão alimentar (B) peso corpóreo (C) Fosforilação do receptor IR (D) e da proteína AKT (E) Fosforilação da proteína JAK2 e (F) da proteína STAT3 medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo.

Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Para avaliar se a melhora na sinalização de insulina e leptina no hipotálamo não foi a partir da perda de peso desses animais, foi realizado o experimento pair-weight, que consiste em nivelar o peso corpóreo entre os grupos estudados (**Fig 9 A**).

Foi demonstrado um aumento da fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina como o IR e AKT no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig 9 B-C**). Assim como, também foi demonstrado um aumento da fosforilação das proteínas JAK2 e STAT3, pertencentes à via de sinalização de leptina, no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (**Fig 9 D-E**). Sugerindo assim que o aumento da fosforilação das proteínas IR, AKT e JAK2 e STAT3 em resposta à insulina e leptina não é decorrente da diminuição da adiposidade e sim, pela inibição da IKK $\epsilon$  no hipotálamo.

# Figura 9



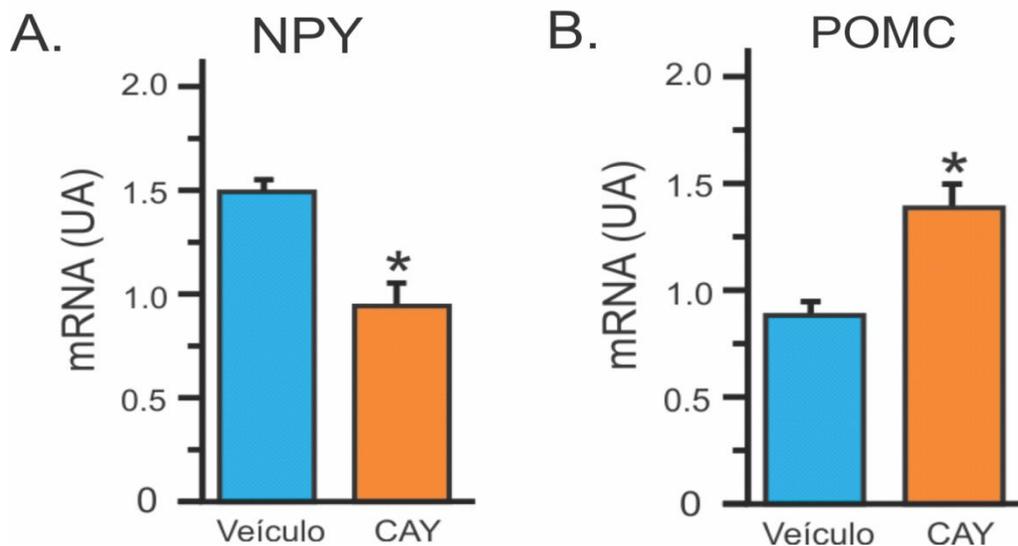
**Figura 9: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora a ação e sinalização da insulina e leptina em animais submetidos ao pair-weight**

Camundongos tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram seu (A) peso corpóreo (B) Adiposo epididimal (C) e Retroperitoneal (D) Fosforilação do receptor IR (E) e da proteína AKT (F) Fosforilação da proteína JAK2 e (G) da proteína STAT3

medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Adicionalmente, investigamos a expressão de neuropeptídeos em animais obesos tratados ou não com CAY. Observamos um aumento da expressão de POMC (mRNA) (Fig. 10 A) e uma diminuição da expressão de NPY (mRNA) (Fig. 10 B) nos animais tratados com CAY comparados aos animais veículos. Sugerindo que a inibição da IKK $\epsilon$  influencia a expressão de neuropeptídeos ligados ao metabolismo energético. Houve um aumento da expressão do neuropeptídeo POMC, cujo metabólito é o alfa-MSH que é anorexigênico. Em contrapartida, uma redução do neuropeptídeo NPY que é orexigênico.

## Figura 10



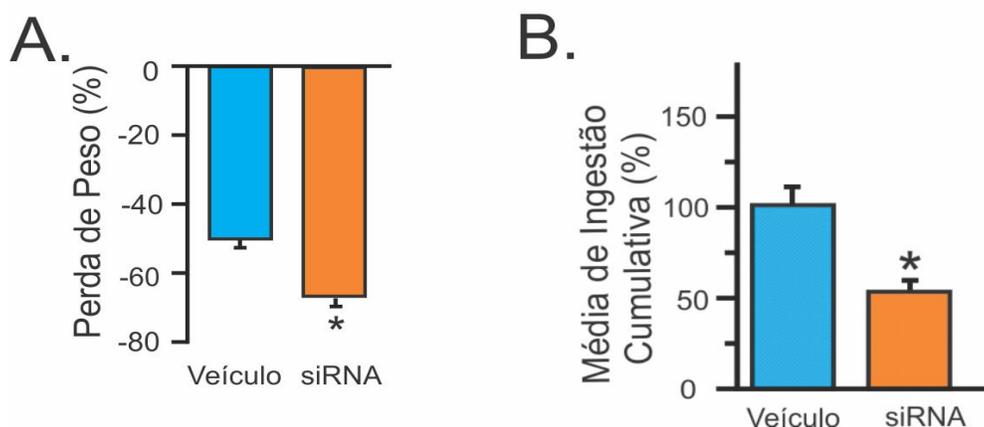
**Figura 10: Expressão gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos após tratamento com CAY.**

Foram utilizados camundongos em dieta hiperlipídica em jejum (24h) tratados com veículo ou CAY.

Expressão gênica de (A) neuropeptídeo Y (NPY), (B) POMC (Pro-opiomelanocortin). Foram estudados 6 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. # $p < 0.05$  vs. veículo.

A inibição da IKK $\epsilon$  com siRNA no hipotálamo também foi eficiente (dados não mostrados) e houve uma significativa perda de peso e uma redução da ingestão alimentar (**Fig 11-A; B**). Confirmando os dados obtidos com o inibidor farmacológico.

## Figura 11

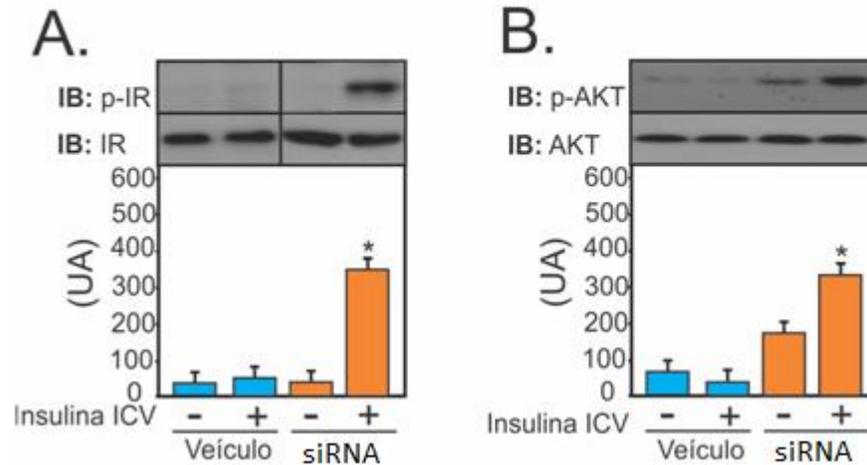


**Figura 11: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica com siRNA altera o peso corpóreo e a ingestão alimentar de animais obesos**

Camundongos em dieta hiperlipídica tratados com veículo (scramble) ou siRNA intracerebroventricular tiveram seu (A) peso corpóreo (B) Ingestão de 24 horas medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média.  $p < 0.05$  vs. veículo

Houve um aumento da fosforilação das proteínas da vida de sinalização de insulina IR e AKT no hipotálamo de camundongos com a IKK $\epsilon$  inibida por siRNA (**Fig 12 A-B**).

# Figura 12

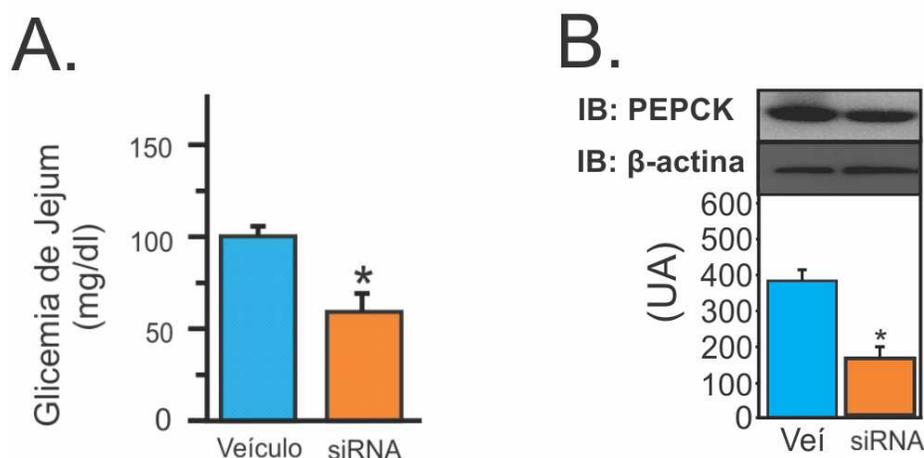


**Figura 12: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica com siRNA melhora a sinalização da insulina em animais obesos**

Camundongos em dieta hiperlipídica tratados com veículo (scramble) ou siRNA intracerebroventricular tiveram sua (A). Fosforilação do receptor IR (B) e da proteína AKT medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. demais grupos.

A inibição da IKK $\epsilon$  por siRNA no hipotálamo diminuiu a glicemia de jejum em camundongos com obesidade induzida por dieta (**Fig 13-A**). Nesse mesmo grupo a expressão proteica de PEPCCK estava diminuída no fígado (**Fig 13-B**).

# Figura 13

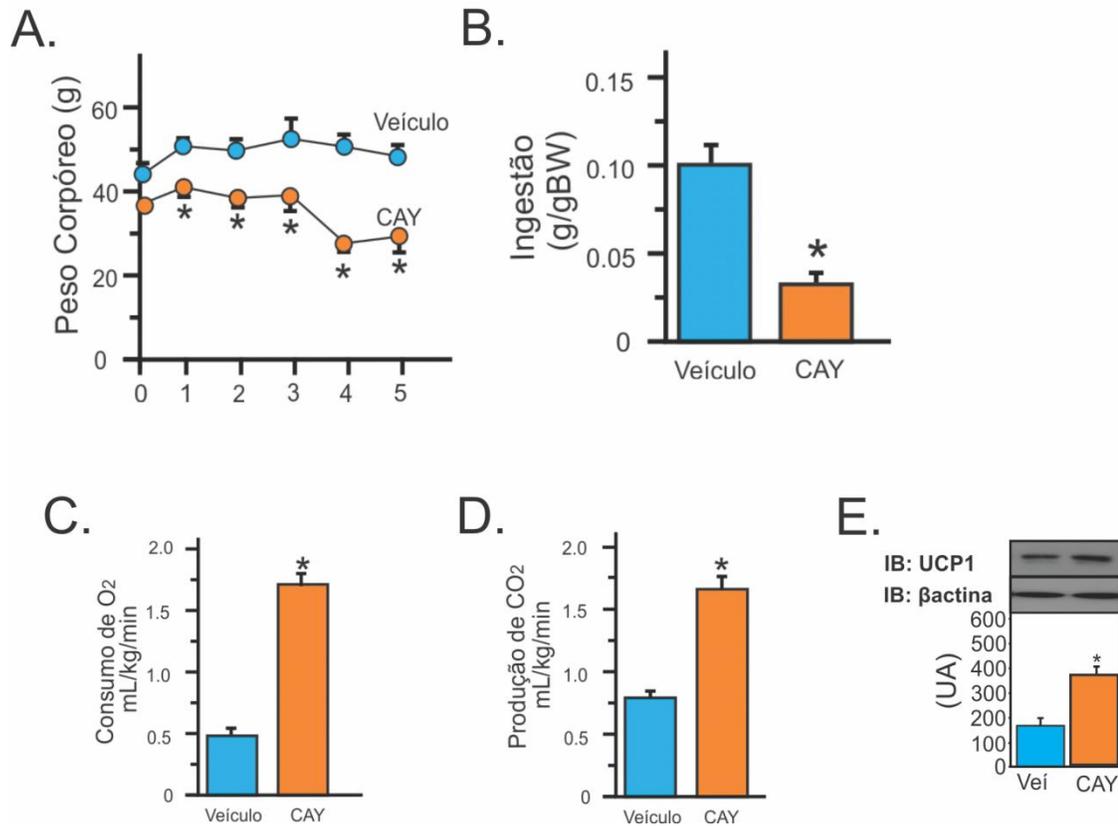


**Figura 13: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica com siRNA reduz a glicemia de jejum e a expressão proteica de PEPCK em fígado de animais obesos**

Camundongos em dieta hiperlipídica tratados com veículo (scramble) ou siRNA intracerebroventricular tiveram sua (A) glicemia de jejum (B) e expressão da proteína PEPCK medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Em A os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Como a expressão de IKK $\epsilon$  foi mais elevada no hipotálamo de camundongos db/db, investigamos se a inibição IKK $\epsilon$  no hipotálamo destes camundongos poderia melhorar os parâmetros metabólicos. Podemos assim observar que a inibição da IKK $\epsilon$  no hipotálamo de camundongos db/db induziu diminuição no peso e na ingestão alimentar (**Fig 14 A-B**), um aumento no gasto energético (**Fig 14 C**) e um aumento na expressão de UCP1 no BAT (**Fig 14 D**).

# Figura 14



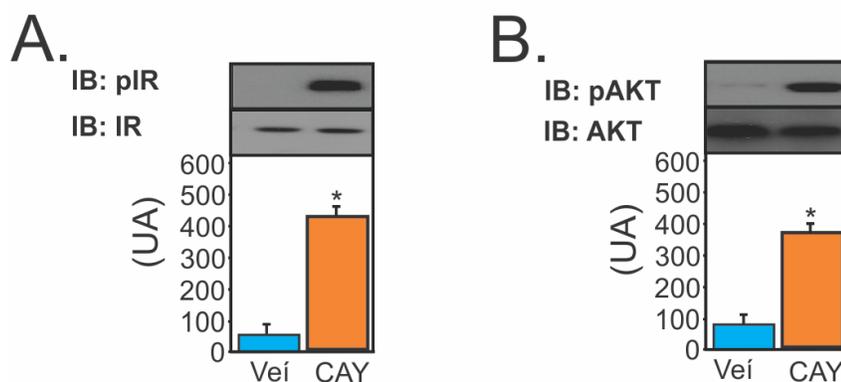
**Figura 14: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora o metabolismo energético e de glicose de animais db/db**

Camundongos db/db tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram seu (A) peso corpóreo (B) ingestão alimentar (C) Consumo de Oxigênio (D) Produção de gás carbônico e (E) expressão da proteína UCP-1 em BAT (tecido adiposo marrom) medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Em A, B, C e D os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Foi observado um aumento da fosforilação das proteínas IR e da AKT em resposta à insulina no hipotálamo de camundongos db/db com a IKK $\epsilon$  inibida por CAY (Fig 15 A-B ). Sugerindo que a IKK $\epsilon$  pode ter um papel importante na

regulação da sensibilidade hipotalâmica à insulina em camundongos db/db, da mesma forma que no camundongo C57/BL6/J obeso. Portanto, pela inibição apenas da IKK $\epsilon$  em hipotálamo, os animais demonstraram uma melhora na sensibilidade a este hormônio.

## Figura 15

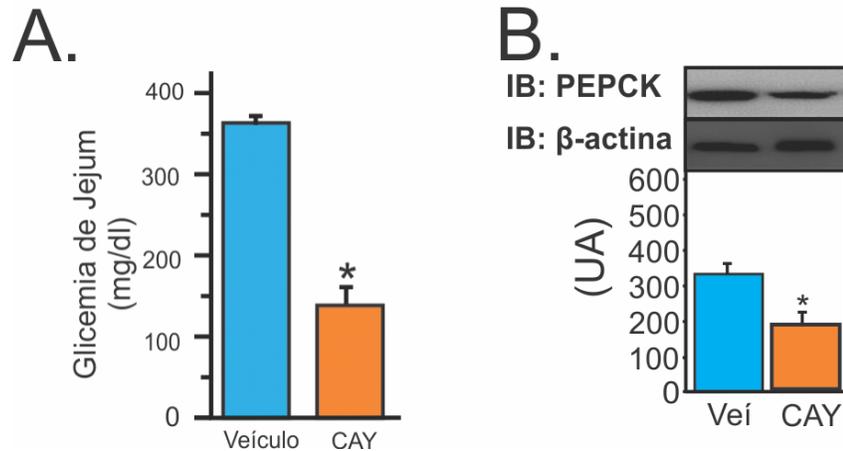


**Figura 15: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora a sinalização da insulina em animais db/db**

Camundongos db/db tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram sua (A) Fosforilação do receptor IR (B) e da proteína AKT medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

Observou-se também, uma redução significativa da glicemia de jejum acompanhado por uma diminuição na expressão de PEPCK no fígado de camundongos db/db tratados com CAY (**FIG 16 A,B**). Isto sugere que a IKK $\epsilon$  pode participar dos mecanismos que induzem alteração do metabolismo da glicose nos animais db/db.

# Figura 16



**Figura 16: Inibição da IKK $\epsilon$  hipotalâmica melhora o metabolismo da glicose de animais db/db**

Camundongos db/db tratados com veículo ou CAY intracerebroventricular tiveram sua (A) glicemia de jejum (B) expressão da proteína PEPCK medidos. Foram estudados 10 animais em cada grupo. Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. veículo.

# *Discussão*

No presente estudo, foi demonstrado, pela primeira vez, que animais com obesidade induzida por dieta ou com obesidade genética, como db/db, apresentaram um aumento da expressão protéica de IKK $\epsilon$  em hipotálamo. Este aumento foi associado à resistência hipotalâmica à insulina e leptina, sugerindo um papel importante da IKK $\epsilon$  em mediar resistência à insulina ligada à obesidade induzida por dieta.

A ativação da via inflamatória IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B tem sido descrita como um dos principais mecanismos de resistência à insulina que ocorre na obesidade [14]. Nesta linha, a serina-quinase IKK $\beta$  foi o foco de vários estudos. ZHANG et al, em 2008, demonstraram que a via IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B estava ativada em hipotálamo de animais obesos e que este fenômeno gerava resistência hipotalâmica aos efeitos anorexigênicos de insulina e leptina. Assim, sugeriu a importância da ativação da via IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B na indução de resistência hipotalâmica à insulina e leptina em animais obesos. Em adição demonstraram que a deleção da IKK $\beta$  no sistema nervoso central ou em neurônios AgRP protegia os animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, além de manter a ação anorexigênica da insulina e leptina pérvias [21].

Recentemente, CHIANG et al., em 2009, demonstraram que a expressão gênica de outra isoforma de IKK, IKK $\epsilon$ , estava mais aumentada do que a expressão de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  em tecidos como fígado e adiposo de animais que receberam dieta hiperlipídica. Além disso, os animais *knockouts* (KO) globais para IKK $\epsilon$  eram protegidos de obesidade e resistência à insulina quando submetidos à dieta hiperlipídica [20]. Como a IKK $\epsilon$  é também uma serina quinase, os autores destacaram sua importância no desenvolvimento da inflamação crônica e resistência à insulina associadas à obesidade.

Apesar dos animais IKK $\epsilon$  KO terem menor adiposidade, em comparação aos controles, apresentavam uma ingestão alimentar aumentada. Portanto, a explicação do menor peso foi devido ao aumento no gasto energético. No presente estudo, a IKK $\epsilon$  foi inibida durante cinco dias por meio de injeções ICV de

CAY ou por continua infusão de siRNA ICV em animais obesos. Neste período os animais apresentaram uma redução de adiposidade que foi associada com uma redução de ingestão alimentar. A diferença nos resultados de ingestão alimentar entre o presente estudo e o estudo de CHIANG (2009) pode ser devido ao tempo de inibição da IKK $\epsilon$ . No presente estudo a IKK $\epsilon$  foi inibida por um curto período, cinco dias, comparada com a inibição prolongada em animais IKK $\epsilon$  KO. Os animais IKK $\epsilon$  KO podem ter tido alguma compensação na regulação da ingestão alimentar para tentar minimizar a perda de peso que estes apresentavam. Entretanto, estes mecanismos não foram estudados por CHIANG et al. No presente estudo, a redução da ingestão em animais com a IKK $\epsilon$  inibida foi associada com a maior expressão de POMC, cuja metabolização gera  $\alpha$ -MSH que é anorexigênico. Corroborando com a tendência à hipofagia, verificou-se menor expressão de NPY que é orexigênico. Em conjunto, estes resultados destacam o papel da IKK $\epsilon$  na regulação da ingestão alimentar.

A ação da insulina e leptina no hipotálamo induzem hipofagia [25]. O tratamento com CAY ou siRNA melhorou os efeitos anorexigênicos da insulina e leptina de animais obesos. Esta melhora na ação destes hormônios foi associada ao aumento da fosforilação do receptor de insulina e da AKT em resposta à insulina e da fosforilação da JAK2 e STAT3 em resposta à leptina em hipotálamo de camundongos com obesidade induzida por dieta. Estes efeitos persistiram nos experimentos de pair-feeding e pair-weight, sugerindo que a inibição da IKK $\epsilon$  no hipotálamo melhora a ação e sinalização da insulina e leptina independentemente da adiposidade.

O mecanismo pelo qual a inibição da serina quinase IKK $\epsilon$  no hipotálamo de animais obesos melhora a ação e sinalização de insulina parece ser pela redução da fosforilação em serina do IRS-1. De fato, a fosforilação do IRS1<sup>Ser307</sup> foi reduzida após tratamento com CAY ou siRNA. IKK $\epsilon$  parece ser a serina quinase inibida, pois além do siRNA ser bem específico, a inibição com CAY e siRNA não alterou a fosforilação de IKK $\alpha/\beta$  em hipotálamo.

Além da redução da fosforilação em serina do IRS-1, observou-se uma maior fosforilação do receptor de insulina. Isto sugere que em paralelo aos efeitos da inibição da serina quinase IKK $\epsilon$ , outros mecanismos podem estar envolvidos na maior fosforilação do IR. Entretanto, estes mecanismos não foram estudados. Pode-se fazer a hipótese que pode ter havido uma redução de fosfatases como a PTP1B em animais com inibição de IKK $\epsilon$  no hipotálamo. A redução da expressão de PTP1B no hipotálamo é associada a uma melhora no sinal de insulina e leptina [26-28]

O mecanismo pelo qual a inibição da IKK $\epsilon$  no hipotálamo melhora a ação e sinalização da leptina não é ainda conhecido. No entanto, foi demonstrado que a ativação da IKK $\epsilon$  aumenta a migração do NF $\kappa$ B para o núcleo, aumentando assim a expressão da fosfatase PTP1B [26-28]. Neste sentido, pode-se aventar a hipótese de que a inibição da IKK $\epsilon$  no hipotálamo pode ter reduzido a migração do NF $\kappa$ B para o núcleo, diminuindo a expressão de PTP1B neste tecido. Entretanto, esta hipótese não foi investigada no nosso estudo, sendo necessários outros experimentos para ser comprovada.

A menor adiposidade encontrada em animais com inibição da IKK $\epsilon$  em hipotálamo pode ser decorrente também de um gasto energético aumentado. No presente estudo, verificou-se um aumento do consumo de oxigênio e da expressão de UCP-1 no tecido adiposo marrom. Este resultado foi semelhante ao encontrado em animais IKK $\epsilon$  KO [20]. Parece que o excessivo gasto energético é uma característica marcante destes animais. Nos experimentos com pair-feeding apesar de manter-se a mesma ingestão para os grupos, os animais tratados com CAY tiveram uma perda de peso aumentada em comparação ao grupo tratado com veículo. Em conjunto, estes dados sugerem que a IKK $\epsilon$  tem um importante papel no controle do balanço energético.

A inibição da IKK $\epsilon$  por CAY ou siRNA no hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta resultou em uma diminuição da glicemia de jejum. Esta redução foi mais exorbitante em animais db/db. Além disso, houve uma

redução da glicemia durante o teste do piruvato, sugerindo uma menor produção hepática de glicose. Estes resultados foram associados à menor expressão protéica de PEPCK em fígado, proteína envolvida na gliconeogênese hepática. É conhecido que infusão de insulina no terceiro ventrículo ou diretamente na região mediobasal do hipotálamo reduzem a gliconeogênese hepática. Este efeito é mediado pelo nervo vago. Adicionalmente, a resistência hipotalâmica à insulina pode levar ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 [29-31]. Em todos estes estudos foi sugerido que a ação hipotalâmica da insulina é necessária para inibir o fluxo de glicose pelo fígado e que defeitos nessa ação central podem levar a uma alteração na regulação da produção hepática de glicose. Em conjunto, pode-se aventar a hipótese de que a inibição hipotalâmica da IKK $\epsilon$  pode ter melhorado a ação e sinalização de insulina neste tecido o que pode ter refletido na produção de glicose pelo fígado. Assim, parece que a IKK $\epsilon$  além de influenciar o metabolismo energético também tem um papel no controle do metabolismo da glicose.

A resposta inflamatória induzida pela obesidade no fígado e no tecido adiposo inclui a mais tipos de células que o esperado, mas carece de muitos dos sinais cardinais da inflamação clássica (ou seja, dor, rubor, Calor, tumor). Isto levou Hotamisligil et al. [32] a criar o termo "*meta-inflammation*" para descrever a inflamação induzida pela obesidade.

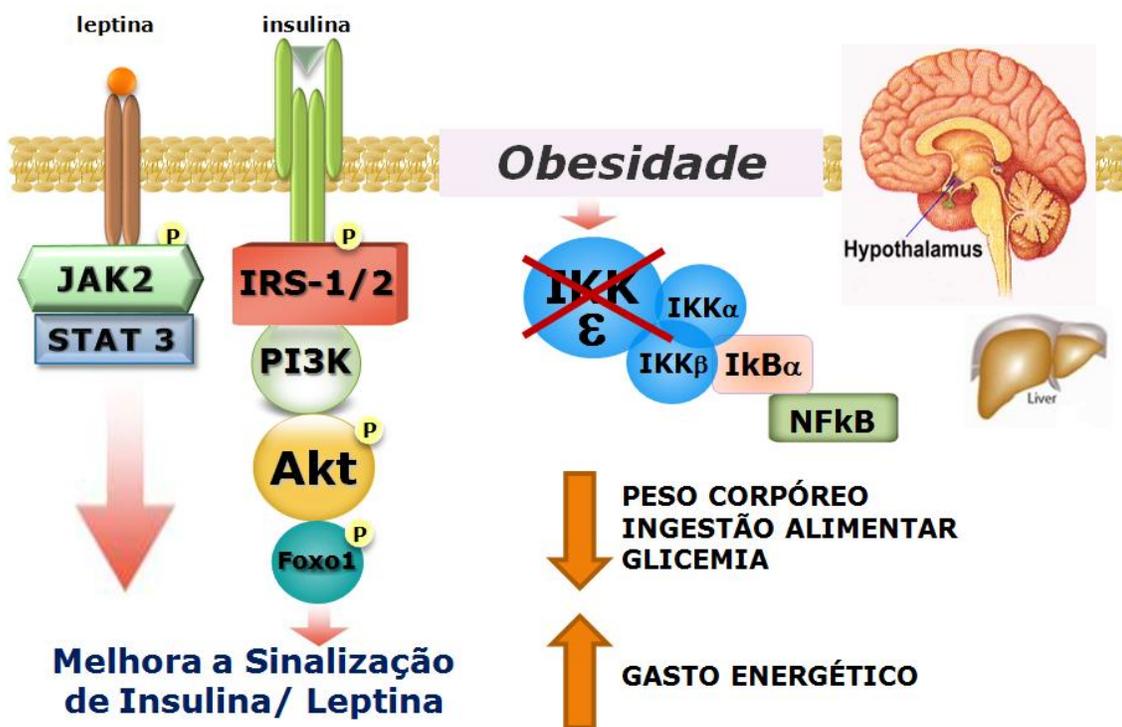
A ligação entre a obesidade e a inflamação subclínica é representada pela ativação da via NF $\kappa$ B. Além da canônica sinalização do NF $\kappa$ B, dois inibidores de I $\kappa$ B não canônicos, como as quinases IKK $\epsilon$  e TBK1, foram descritos como ativadores de NF $\kappa$ B em células imunológicas [33]. Nesta linha, Reilly et al. demonstraram que a droga anti-inflamatória amlexanox, é um inibidor de IKK $\epsilon$  e TBK1. O tratamento crônico, por gavagem, com este inibidor leva a redução na inflamação subclínica, além de aumentar a sensibilidade à insulina, gasto energético, temperatura corporal e expressão da UCP1 em tecido adiposo, acompanhado de uma diminuição de peso em animais geneticamente obesos ou com obesidade induzida por dieta [33]. Entretanto, neste estudo os autores não diferenciam os efeitos da inibição de IKK $\epsilon$  e de TBK1.

Os resultados obtidos com siRNA, no nosso estudo, sugerem que a inibição da IKK $\epsilon$  foi determinante e não o TBK1 para redução de peso, ingestão e aumento do gasto energético. Nossos resultados foram similares ao encontrado em camundongos IKK $\epsilon$  KO.

Em resumo, os dados sugerem que a expressão de IKK $\epsilon$  hipotalâmica é maior em animais obesos e pode participar do desenvolvimento da resistência à insulina e leptina neste tecido. Sua inibição reduz a adiposidade, ingestão alimentar e aumenta o gasto energético. A inibição da IKK $\epsilon$  além de influenciar o balanço energético altera também o metabolismo de glicose. Assim, pode-se sugerir que a IKK $\epsilon$  representa uma ligação entre a obesidade e resistência à insulina e leptina no hipotálamo e pode ser um alvo terapêutico para o tratamento da obesidade, resistência à insulina e diabetes.

# *Conclusão*

1. A obesidade aumenta a expressão de IKK $\epsilon$  também em hipotálamo.
2. A IKK $\epsilon$  pode fazer parte do mecanismo inflamatório ativado pela obesidade na indução de resistência à insulina e leptina no hipotálamo.
3. A inibição de IKK $\epsilon$  especificamente em hipotálamo tem um papel essencial no metabolismo energético, incluindo regulação de adiposidade, ingestão e gasto energético.
4. A inibição de IKK $\epsilon$  especificamente em hipotálamo afeta o metabolismo de glicose hepática, provavelmente por melhorar a sinalização de insulina.
5. A identificação do papel da IKK $\epsilon$  em hipotálamo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas com objetivo de reverter ou prevenir a instalação de obesidade e suas comorbidades.



*Referências*

*Bibliográficas*

1. Baker, S.T., et al., *Less fat reduction per unit weight loss in type 2 diabetic compared with nondiabetic obese individuals completing a very-low-calorie diet program*. *Metabolism*, 2012. **61**(6): p. 873-82.
2. Sturm, R., *Increases in morbid obesity in the USA: 2000-2005*. *Public Health*, 2007. **121**(7): p. 492-6.
3. Bezerra, I.N., C. Curioni, and R. Sichieri, *Association between eating out of home and body weight*. *Nutr Rev*, 2012. **70**(2): p. 65-79.
4. Belgardt, B.F., et al., *PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response*. *Cell Metab*, 2008. **7**(4): p. 291-301.
5. Carnevali, J.B., et al., *Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus*. *FEBS Lett*, 2001. **500**(3): p. 119-24.
6. Xu, A.W., et al., *Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance*. *PLoS Biol*, 2005. **3**(12): p. e415.
7. Plum, L., M. Schubert, and J.C. Bruning, *The role of insulin receptor signaling in the brain*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(2): p. 59-65.
8. Velloso, L.A., *[The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity]*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2006. **50**(2): p. 165-76.
9. Sasaki, T. and T. Kitamura, *Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake*. *Endocr J*, 2010. **57**(11): p. 939-46.
10. Bjorbaek, C., et al., *Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(51): p. 32686-95.
11. Bruning, J.C., et al., *Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction*. *Science*, 2000. **289**(5487): p. 2122-5.
12. Burks, D.J., et al., *IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis*. *Nature*, 2000. **407**(6802): p. 377-82.
13. Obici, S., et al., *Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats*. *Nat Neurosci*, 2002. **5**(6): p. 566-72.
14. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
15. Bakkar, N. and D.C. Guttridge, *NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(2): p. 495-511.
16. Bamborough, P., et al., *5-(1H-Benzimidazol-1-yl)-3-alkoxy-2-thiophenecarbonitriles as potent, selective, inhibitors of IKK-epsilon kinase*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. **16**(24): p. 6236-40.
17. Aupperle, K.R., et al., *Expression and regulation of inducible I kappa B kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes*. *Cell Immunol*, 2001. **214**(1): p. 54-9.
18. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. *Nat Med*, 2005. **11**(2): p. 191-8.
19. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB*. *Nat Med*, 2005. **11**(2): p. 183-90.
20. Chiang, S.H., et al., *The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice*. *Cell*, 2009. **138**(5): p. 961-75.
21. Zhang, X., et al., *Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity*. *Cell*, 2008. **135**(1): p. 61-73.
22. Prada, P.O., et al., *L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity*. *Diabetologia*, 2007. **50**(9): p. 1949-59.

23. Prada, P.O., et al., *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**(3): p. 1576-87.
24. Romanatto, T., et al., *Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36213-22.
25. Niswender, K.D., et al., *Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 227-31.
26. Picardi, P.K., et al., *Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 3870-80.
27. Milanski, M., et al., *Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 359-70.
28. Ropelle, E.R., et al., *Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 10): p. 2341-51.
29. Obici, S., et al., *Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production*. Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1376-82.
30. Morton, G.J., *Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism*. J Physiol, 2007. **583**(Pt 2): p. 437-43.
31. Pocai, A., et al., *Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance*. Diabetes, 2005. **54**(11): p. 3182-9.
32. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 415-45.
33. Reilly, S.M., et al., *An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-varepsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice*. Nat Med, 2013. **19**(3): p. 313-21.