

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ERIKA ANNE DE FREITAS ROBLES ROMAN

MODULAÇÃO DO METABOLISMO MUSCULAR DA GLICOSE PELA AÇÃO
HIPOTALÂMICA DA LEPTINA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Erika Anne de Freitas
Robles Roman
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Tese apresentada à Pós-Graduação
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Doutor
em Biologia Funcional e Molecular,
área de concentração em Fisiologia.*

Orientador – Prof. Dr. MÁRCIO ALBERTO TORSONI

Co-orientador – Prof. Dr. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

CAMPINAS

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R661m Roman, Erika Anne de Freitas Robles, 1979-
Modulação do metabolismo muscular da glicose pela
ação hipotalâmica da leptina / Erika Anne de Freitas
Robles Roman. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Márcio Alberto Torsoni.
Coorientador: Lício Augusto Velloso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hipotálamo. 2. Homeostase da glicose. 3.
Leptina. 4. Músculo esquelético. 5. Resistência à
insulina. I. Torsoni, Márcio Alberto, 1967-. II. Velloso,
Lício Augusto, 1963-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Modulation of glucose metabolism in muscle by the leptin
hypothalamic action

Palavras-chave em Inglês:

Hypothalamus
Glucose homeostasis
Leptin
Skeletal muscle
Insulin resistance

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Márcio Alberto Torsoni [Orientador]
Eliana Pereira Araújo
Leonardo dos Reis Silveira
Márcia Queiroz Latorraca
Mário José Abdalla Saad

Data da defesa: 16-08-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador – Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Co-orientador – Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Membros

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni (Orientador) _____

Profª. Drª. Eliana Pereira de Araújo _____

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira _____

Profª. Drª. Márcia Queiroz Latorraca _____

Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad _____

Profª. Drª. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva _____

Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara _____

Profª. Drª. Mônica Marques Telles _____

Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Fisiologia, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Data: 16/08/2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduardo e Terezinha.

Fonte de amor, incentivo e porto seguro...sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus. A quem, se me concedesse pedir, eu ainda O agradeceria. Pela paciência com as minhas muitas imperfeições...Estou certa de que se não fosse a sua força e presença em mim nada disso seria possível, pois inteligência apenas não basta, é necessário também serenidade...que só d'Ele vem. Agradeço-O, sobretudo pela trajetória e por todos os anjos que Ele tem posto no meu caminho que, aliás, são muitos...

Aos meus pais, Eduardo e Terezinha, meu porto seguro...Agradeço-os pelo amor incondicional dispensado a mim...jamais poderia pagá-los por tudo o que fizeram por mim...uma vida inteira não seria suficiente...Em especial gostaria de agradecer a minha querida mamãe, a quem certamente e, se me fosse possível, transferiria meu título.

Aos meus irmãos: Eliezer, Eduardo, Edivânia e Elifaz. Os anjos que Deus colocou na minha infância e na minha jornada, sem que houvesse qualquer merecimento da minha parte.

Aos meus sobrinhos: Damaris, Raul, Lídia, Rene, Eliezer, Eduardo, Igor e Eloisa. Anjos que colorei rotineiramente a minha vida. Vocês são minha fonte de inspiração, alegria e amor genuíno...verdadeiros presentes de Deus. Amo vocês!!!

Ao meu querido orientador Prof. Márcio Torsoni...Como é difícil falar de você, Márcio....não consigo nem encontrar as teclas adequadas de tanto que me emociono...Neste ano se completam 12 anos desde que começou a me orientar lá na Bioquímica....Sabe Márcio, todas as vezes que pensava em escrever meus agradecimentos a você perdia até noites de sono...vezes sem conta fui dormir no meio da madrugada pensando em como seria difícil te agradecer...na verdade impossível...Ainda que formalmente, não sejamos mais orientador e aluna sempre considerarei você como um anjo que Deus colocou no meu caminho para me acompanhar por tantos anos...um anjo

meio desastrado, que volta e meia comete umas gafes, mas de um coração e de uma sensibilidade sem precedentes...Super Boss, obrigada por ser essa pessoa tão especial...eu diria até que com poderes especiais...risos...inclusive os de me (des)orientar...risos...

Ao meu caro coorientador Prof. Lício Velloso. Lamento muito por não poder colocá-lo junto ao Márcio na minha banca de defesa de tese. Assim como muitas vezes encontramos um adendo nos artigos dizendo que os autores trabalharam igualmente...devo dizer Lício que sua contribuição para a minha formação como profissional e como um ser humano melhor foi tão importante quanto a do Márcio...Tenho certeza que Deus o colocou no meu caminho, também como um anjo, na verdade menos desastrado que o Márcio, para ajudá-lo na empreitada de me orientar porque para ele coitado, levar essa cruz sozinho não seria muito fácil...kkk...Não à toa o chamamos de Big Boss, por sua grandeza como ser humano e sobretudo pela grandeza de sua humildade.

Agradeço as queridas professoras e amigas: Adriana Torsoni, Eliana Araújo e Marciane Milanski. Obrigada meninas pelo carinho e amizade que tornaram essa caminhada tão prazerosa.

Agradeço em especial a minha *coworker* Talita Romanatto. Tata, lembro com tantas saudades da época em que trabalhávamos juntas...você faz muita falta, amiga...

Agradeço a todos os professores, alunos e amigos que independente de estarem perto ou longe de mim nesse momento, sou ciente da contribuição de vocês para a minha formação. Não posso fazer um parágrafo de agradecimento a cada um, mas mais do que uma mensagem escrita é a mensagem da vida, então espero que ao longo de todos esses anos de convívio eu tenha tido a oportunidade de mostrar como cada um de vocês é importante para mim. E se ainda não o fiz, desejo ter essa oportunidade no tempo que Deus ainda me reserva...Obrigada queridos...Alessandra Girasol, Ana Paula Arruda, Ana Paula Barbosa, Andressa Coope, Andrezza Kinote, Bruna

Bombassaro, Carina Solon, Carla Nuñez, Daniela Razolli, Daniele Vitorino, Prof. Dennys Cintra, Fernando Ganzarolli, Prof. Gabriel Anhê, Gabriela Albuquerque, Gabriela Freitas, Graziela Stoppa, Giovanna Degasperi, Helena Barbosa, Íkaro Bréder, Joseane Morari, Juliana Contin, Juliana Faria, Letícia Souza, Livia Bitencourt, Lucas Nascimento, Prof. Mário Saad, Maristela Cesquini, Profª. Raquel Leal, Raphaël Denis, Ricardo Contarteze (*In memorian*), Rodrigo Moura, Simone Lee, Sylka Geloneze, Thiago Araújo, Vinícius Pereira, Vivian Calegari.

Agradeço aos mais queridos técnicos do Labsinzel: Gerson Ferraz e Márcio Cruz, pelo suporte técnico tão eficaz e pela presteza em SEMPRE me socorrer. Vocês são demais!!!

Agradeço a todos os funcionários da FCM, em especial: Sr. Antônio, Erasmo, Jorge, Sr. Jósimo, Sr. Lú, Luís, Sr. Zé. Agradeço ainda os funcionários do Laboratório de Cirurgia (Ana, Dito, Miguel e William) e todas as meninas da limpeza, os quais sempre foram muito prontos em me auxiliar. Agradeço ainda os funcionários da Pós-graduação do IB, em especial: Andréa Vigilato, Sílvia Helena e Rafael que com muita paciência me instruíram acerca das minhas dúvidas.

Finalmente agradeço, pelo financiamento, as agências de fomento à pesquisa: FAPESP e CNPq e também a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (FCM e IB) por essa tão grande oportunidade que me concederam para que eu pudesse desenvolver meu doutorado.

Termino dizendo que pronunciar apenas obrigada é muito pouco para expressar a gratidão e o amor que sinto nesse momento...ainda que esta seja uma palavra pequena, que seja tão simples e comumente usada por nós, deposito nela todo o meu sentimento de gratidão e amor...OBRIGADA a todos!!!

EPÍGRAFE

“Os que semeiam em lágrimas segarão com alegria.

*Aquele que leva a preciosa semente, andando e chorando, voltará sem dúvida com alegria, trazendo
consigo os seus molhos”.*

(Salmos, 126:5-6)

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1 – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	17
2 – CAPÍTULO	49
ARTIGO 1 – “Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 α activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism”. Molecular and Cellular Endocrinology 2010; 314:62-9.....	50
3 – DISCUSSÃO GERAL	73
4 – CONCLUSÃO GERAL	79
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
6 – APÊNDICE	97
Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa/Unicamp).....	98
Artigos Publicados e Artigos Submetidos.....	99
Principais Trabalhos Apresentados em Congressos.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ADP	Difosfato de Adenosina
AG490	Inibidor de JAK2
AgRP	Proteína Relacionada ao “Agouti”
AKT	Proteína Quinase B
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Quinase Ativada por 5'AMP
α -MSH	Hormônio Estimulador α -Melanocítico
ARC	Núcleo Arqueado
ATP	Trifosfato de Adenosina
BAT	Tecido Adiposo Marrom
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
C75 Sintase)	Ácido Tetrahydro-4-Metileno-2R-Octil-5-Oxo-3S-Furancarboxílico (Inibidor de Ácido Graxo Sintase)
CART	Peptídeo Regulado por Cocaína e Anfetamina
CPT1	Carnitina Palmitoil-CoA Transferase
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
c-Src	Tirosina Quinase c-Src
CVD	Doenças Cardiovasculares
DAG	Diacylglicerol
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMN	Núcleo Dorsomedial
EDL	Extensor Digitorum Longus
ENDEF	Estudo Nacional de Despesa Familiar
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FACoA	AcilCoA
FAS	Ácido Graxo Sintase

G6Pase	Glicose-6-Fosfatase
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GLUT4	Transportador de Glicose 4
HGP	Produção Hepática de Glicose
IARC	Agência Internacional para Pesquisas sobre o Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICV	Intracerebroventricular
IGT	Intolerância à Glicose
IHP	Intrahipotalâmico
IL1 β	Interleucina-1 β
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IMC	Índice de Massa Corpórea
IP	Intraperitoneal
ipGTT	Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose
IRS1/2	Substrato do Receptor de Insulina 1 e 2
JAK2	Janus Quinase 2
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LY294002	2-(4-Morfolinil)-8-Fenil-4H-1-Benzopirano-4-Um (Inibidor de PI3K)
MC3R	Receptor de Melanocortina 3
MC4R	Receptor de Melanocortina 4
MCH	Hormônio Concentrador de Melanina
MCP1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MTII	Agonista do Receptor de Melanocortina II
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NEFAS	Ácidos Graxos Não Esterificados
NF κ B	Fator Nuclear kappa B
NIDDM	Diabetes Mellitus Não Insulino Dependente

NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor de Leptina
OMS ou WHO	Organização Mundial de Saúde
PAI-I	Inibidor I do Ativador de Plasminogênio
PDH	Piruvato Desidrogenase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PGC1 α	Coativador 1 α do Receptor γ Ativado por Proliferador de Peroxissomo
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Quinase
PKA	Proteína Quinase A
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
POMC	Pro-opiomelanocortina
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição
PVN	Núcleo Paraventricular
SF-1	Fator Esteroidogênico-1
SM	Músculo Esquelético
SNC	Sistema Nervoso Central
SNSA	Sistema Nervoso Simpático Autônomo
SOCS3	Proteína Supressora da Sinalização das Citocinas 3
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
Tyr	Tirosina
UCP1	Proteína Desacopladora 1
UCP3	Proteína Desacopladora 3
VMH ou VMN	Hipotálamo ou Núcleo Ventromedial

RESUMO

Sobrepeso e obesidade são caracterizados por um aumento de tecido adiposo corpóreo, que resulta da interação entre muitos fatores, incluindo genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. A obesidade está relacionada ao desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). O principal mecanismo envolvido na associação entre obesidade e DM2 é a indução de uma resposta inflamatória subclínica capaz de gerar resistência à insulina. Este fenômeno é caracterizado pela capacidade reduzida deste hormônio em promover a homeostase glicêmica. O músculo esquelético (SM) é considerado um dos principais tecidos para a homeostase da glicose, já que ele responde por cerca de 80 % da captação total de glicose estimulada pela insulina no corpo. Sendo assim, a resistência à insulina em músculo esquelético é o maior determinante da hiperglicemia e DM2. Por outro lado, a leptina apresenta função crucial na homeostase glicêmica por agir no cérebro e sua ação neste órgão requer a atividade da PI3K para modular a homeostase da glicose e o metabolismo periférico. Contudo, o mecanismo envolvido neste fenômeno não é completamente entendido. Neste estudo nós aventamos a hipótese que a atividade hipotalâmica da PI3K é importante para a modulação da via da quinase dependente de AMP (AMPK)/acetil-CoA carboxilase (ACC), PGC1 α e AKT em músculo esquelético. Para investigar esta questão, injetamos leptina no ventrículo lateral do hipotálamo de ratos. A leptina (ICV) aumentou a fosforilação da JAK2 (80 %) e AKT (350 %) hipotalâmica, quando comparado ao grupo controle. A administração prévia de LY294002 (inibidor químico da PI3K) reduziu a fosforilação da AKT hipotalâmica, induzida por leptina ICV. Adicionalmente, a leptina (ICV) melhorou a tolerância à glicose no GTT (50 %), mas a administração prévia de propranolol (10 mg/kg IP) ou LY294002 (1nmol-ICV) reduziu este efeito. Em músculo *soleus* a fosforilação da AKT, estimulada pela insulina, foi maior no grupo leptina (200 %) do que no grupo controle, contudo a administração prévia de propranolol (IP) reduziu (50 %) este efeito. Como o propranolol a administração prévia de LY294002 (ICV) reduziu (45 %) o efeito da leptina (ICV) sobre a fosforilação da AKT em músculo esquelético. A fosforilação da JAK2, em músculo esquelético, foi maior no grupo leptina (ICV) do que no grupo controle, mas a administração prévia de LY294002 (ICV) bloqueou este efeito. Adicionalmente, a ação central da leptina aumentou a expressão de PGC1 α e a fosforilação da AMPK e ACC em músculo *soleus*. A administração prévia de LY294002 bloqueou estes efeitos. Concluimos que a ativação da via da PI3K hipotalâmica, induzida pela leptina, é importante para a fosforilação da AKT, bem como para a ativação de vias catabólicas através da AMPK e PGC1 α em músculo esquelético. Assim, um defeito na via de sinalização da PI3K no hipotálamo pode contribuir para a resistência periférica à insulina associada à obesidade induzida por dieta.

ABSTRACT

Overweight and obesity are characterized by an increased body fat and result from the interaction of many factors, which include genetic, metabolic, behavioral, and environmental ones. Obesity is a clinical condition highly associated with type 2 diabetes mellitus (DM2). The major reason for the link between obesity and DM2 is the induction of a subclinical inflammatory response which leads to insulin resistance. This phenomenon is characterized by the reduced ability of the pancreatic hormone insulin to promote glucose homeostasis. Skeletal muscle (SM) is considered as one of the most important tissues in glucose homeostasis, because it accounts for 80 % of whole body insulin-stimulated glucose uptake. Therefore, skeletal muscle insulin resistance is a major determinant of hyperglycemia and DM2. In addition, leptin plays a central role in glucose homeostasis acting in the brain and its action in this organ requires PI3K activity to modulate glucose homeostasis and peripheral metabolism. However, the mechanism behind this phenomenon is not clearly understood. We hypothesize that hypothalamic PI3K activity is important for the modulation of AMP-activated protein kinase (AMPK)/acetyl-CoA carboxylase (ACC) pathway, PGC1 α , and AKT in skeletal muscle. To address this issue, we injected leptin into the lateral ventricle of rats. ICV leptin increased the phosphorylation of hypothalamic JAK2 (80 %) and AKT (350 %) when compared to the control group. Previous ICV LY294002 (chemical inhibitor of PI3K) administration reduced hypothalamic AKT phosphorylation, induced by ICV leptin. In addition, ICV leptin improved the clearance of glucose in GTT (50%), but the previous administration of propranolol (10 mg/kg bw-IP) or ICV LY294002 (1nmol-ICV) reduced this effect. In the *soleus* muscle, the AKT phosphorylation, stimulated by insulin, was higher in leptin group (200 %) than the control group, but the previous administration of propranolol (IP) reduced (50 %) this effect. Like propranolol the previous administration of LY294002 (ICV) reduced (45 %) the effect of ICV leptin on AKT phosphorylation in the skeletal muscle. JAK2 phosphorylation, in skeletal muscle, was higher in leptin (ICV) group than the control group, but the previous ICV administration of LY294002 blocked this effect. Additionally, the central action of leptin increased PGC1 α expression, AMPK and ACC phosphorylation in the *soleus* muscle. Previous ICV administration of LY294002 blocked these effects. We conclude that the activation of hypothalamic PI3K pathway is important for leptin-induced AKT phosphorylation, as well as for an active catabolic pathway through AMPK and PGC1 α in skeletal muscle. Thus, a defective leptin signaling PI3K pathway in the hypothalamus may contribute to peripheral resistance to insulin associated to diet-induced obesity.

1 – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

Obesidade: Um breve histórico

A obesidade não é uma exclusividade deste século. Existem registros artísticos, evidenciando que o excesso de peso em seres humanos data de 30.000 – 20.000 anos antes da era Cristã. Três das mais antigas esculturas que comprovam que a obesidade já se fazia presente na pré-história, mais especificamente no período Paleolítico ou Idade da Pedra Lascada, são: Vênus de Willendorf (30.000 – 20.000 aC - Áustria), Lespugue (34.000 – 29.000 aC - França) e Vênus de Laussel (25.000 – 20.000 aC - França) (Figura 1). Segundo alguns teóricos, para o homem paleolítico, seios e cintura pélvica grandes simbolizavam sucesso reprodutivo (Spivey, 2005), para eles a forma feminina do corpo remetia e/ou mesmo enfatizava suas funções biológicas (Clark, 1964). Ainda no período pré-histórico Neolítico, ou Idade da Pedra Polida, que compreende o intervalo entre 8.000 e 5.500 aC, houve a produção de muitas esculturas retratando a obesidade e possivelmente o exemplo mais famoso delas seja “*Mother Goddess*” (6.000 - 5.500 aC) encontrada na antiga Anatólia, atualmente Turquia.

No antigo Egito, as artes presentes em algumas tumbas como a do rei Ankh-ma-Hor (Sexta Dinastia, 2340-2180 aC) e do nobre egípcio Mereruka (2350 aC) revelam que a obesidade era comum entre a realeza egípcia. Estudos de reconstrução de peles de múmias reais sugerem que algumas delas eram obesas, incluindo as das rainhas Ahmose Inhapy (XVII Dinastia), Hatshepsut (XVIII Dinastia, 1473-1458 aC) e a do rei Ramsés III (XX Dinastia, 1194-1163 aC) (Reeves, 1992). Sendo assim, através da arte podemos constatar que a obesidade esteve presente desde há muito tempo nas diversas culturas e principalmente entre as classes sociais mais abastadas, o que na época representava riqueza, poder e também fertilidade.

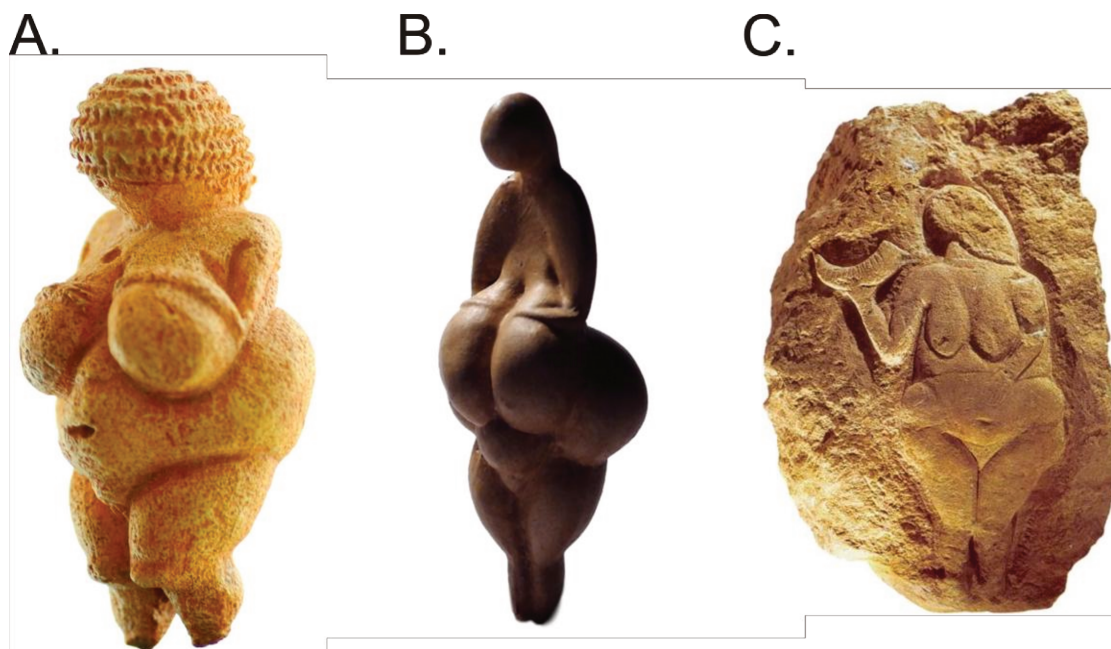


Figura 1 – *Vênus de Willendorf* (30.000 – 20.000 aC - Áustria) (A); *Lespugue* (34.000 – 29.000 aC - França) (B); *Vênus de Laussel* (25.000 – 20.000 aC - França) (C).

A arte é um reflexo sociológico de uma determinada cultura, num determinado tempo e através dela podemos inferir acerca dos hábitos, costumes e valores de um povo. Assim como a literatura, a pintura e a escultura são capazes de nos revelar determinados aspectos da vida do homem em sociedade em uma dada época. Por meio da arte é possível supor que na Idade Média (Séc. V-XV) o pensamento coletivo era de que a obesidade estava relacionada à prosperidade, já a magreza remetia a tuberculose e a doenças crônicas (Klein, 1996). Ainda por meio da arte é possível saber que no Período Renascentista (XIII-XVII) o excesso de peso ou mesmo a obesidade era o padrão de beleza vigente e dentre as obras que retratam o que seria o ideal de beleza dessa época destacam-se: *Mona Lisa* (1503, Leonardo da Vinci), *Concerto Campestre* (1510, Giorgio Barbarelli), *O Rapto das Filhas de Leucipo* (1617, Rubens) (Figura 2), *O Triunfo de Sileno* (1618, Van Dick), *Bathsheba at her Bath* (1654, Rembrandt) e *As três Graças* (1763, Carle Van Loo).



Figura 2 – O rapto das filhas de Leucipo (Rubens, 1671).

Como descrito nos exemplos anteriores, por milhares de anos o acúmulo de peso esteve associado à riqueza, saúde e poder. Porém Hipócrates (460 – 377 aC), considerado o Pai da Medicina Moderna, foi o primeiro a observar que a morte súbita era mais comum entre as pessoas obesas do que magras (Littré, 1839). Além disso, alguns médicos gregos também concluíram, através da prática clínica, que a obesidade era a causa de irregularidades menstruais e infertilidade entre as mulheres. Ainda que nessa época a obesidade não fosse por si considerada como uma enfermidade, já no século XVII um tratado médico tibetano intitulado *“The Blue Beryl”* reconhecia que a obesidade era uma condição que devia ser tratada através da perda de peso. No século seguinte (XVIII) foi publicada a primeira monografia, na língua inglesa, que tinha como objeto de estudo a obesidade. *“A Discourse Concerning the Causes and Effects of Corpulency Together with the Method for Its Prevention and Cure”*, escrita por Short em 1727, já considerava a importância da

prática de exercícios físicos e a adesão a uma dieta moderada e purgativa para prevenir tal condição.

Ainda que Hipócrates tenha sido o primeiro a vislumbrar a obesidade como uma doença (Klein, 1996), somente no século XX, ou seja, mais de 2000 anos depois dessa observação é que a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a obesidade como uma enfermidade. De acordo com a OMS a obesidade é um acúmulo excessivo e anormal de gordura capaz de representar riscos à saúde do indivíduo (WHO, 2011). Sabe-se hoje que esta enfermidade é fruto de complexas interações entre fatores ambientais e genéticos e uma série de publicações tem sugerido que há um conjunto de genes que favorecem o estoque de gordura. Tais genes se tornaram mal adaptados nas sociedades contemporâneas, especialmente as ocidentais que, em decorrência do avanço tecnológico, minimizaram a atividade física e favoreceram a ingestão de alimentos ricos em energia (Chung & Leibel, 2008) e o acúmulo de gordura. Atualmente existem diversos métodos para se quantificar o excesso de peso e dessa maneira contribuir para o diagnóstico da obesidade. Dentre estes métodos o do cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC) é o mais simples e o menos invasivo para o paciente. Tal método foi desenvolvido pelo estatístico belga Adolphe Quételet (1796-1874) e se constitui numa fórmula matemática capaz de mensurar a obesidade. Quételet sugeriu que a razão entre a massa (Kg) do indivíduo dividida pelo quadrado da sua altura (m) ($IMC = m / h^2$) poderia ser utilizada como uma medida de adiposidade (Bray, 2009).

Aspectos Epidemiológicos da Obesidade

Embora desenvolvida no século XIX a fórmula de Quételet é atual e freqüentemente é aplicada pelos profissionais da área da saúde para mensurar a adiposidade dos pacientes. Baseada nesta fórmula, em 1995, um comitê de especialistas da Organização Mundial de Saúde propôs pontos de corte para classificar o estado nutricional de homens e mulheres adultos (Tabela I). Nesta

classificação estabeleceu-se que um IMC ≥ 25 Kg/m² indica sobrepeso e IMC ≥ 30 Kg/m² denota obesidade. Segundo levantamento mundial feito pela OMS, em 2008 cerca de 1.5 bilhão de adultos (> 20 anos) estava acima do peso, enquanto 500 milhões eram obesos (Finucane et al., 2011). As projeções esperadas para a prevalência de sobrepeso e obesidade para o ano de 2015 são de 2.3 bilhões de adultos acima do peso e 700 milhões de obesos em todo o mundo (Farag & Gaballa, 2011).

Classificação	IMC Kg / m ²	
	Pontos de Corte Principais	Pontos de Corte Adicionais
Abaixo do Peso	< 18.50	< 18.50
Magreza Severa	< 16.00	< 16.00
Magreza Moderada	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
Magreza Leve	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49
Faixa Normal	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99
		23.00 - 24.99
Sobrepeso	≥ 25.00	≥ 25.00
Pré-Obesidade	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49
		27.50 - 29.99
Obesidade	≥ 30.00	≥ 30.00
Obesidade Classe I	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49
		32.50 - 34.99
Obesidade Classe II	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49
		37.50 - 39.99
Obesidade Classe III	≥ 40.00	≥ 40.00

Tabela I – Classificação internacional da subnutrição, sobrepeso e obesidade em adultos, de acordo com o Índice de Massa Corpóreo (IMC). Adaptado de WHO, 1995.

Segundo resultados de um estudo realizado entre os anos de 1999-2008 – acerca da prevalência e tendências da obesidade entre os adultos norte-americanos – constatou-se que somente nos Estados Unidos, 68 % da população estavam acima do peso, enquanto aproximadamente 30 % eram obesos (Flegal et al., 2010). Em estudo recente Wang e colaboradores (2008) mostraram que, possivelmente, em 2030 86.3 % da população norte americana apresentará excesso de peso, enquanto 51% serão obesos. No Brasil a Pesquisa de Orçamentos Familiares

(POF, 2010) realizada, entre os anos de 2008-2009, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em parceria com o Ministério da Saúde, revelou que 49% da população estavam acima do peso, enquanto 14.80% eram obesos. Por meio de quatro inquéritos, realizados em território nacional - ENDEF 1974-1975, PNSN 1989, POF 2002/2003 e POF 2008/2009 - foi possível verificar que no Brasil, as prevalências de excesso de peso e obesidade aumentaram continuamente, em ambos os sexos, ao longo de aproximadamente 34 anos. Nessas três décadas a prevalência do excesso de peso em adultos aumentou em quase três vezes no sexo masculino (de 18.5 % para 50.1 %) e em quase duas vezes no sexo feminino (de 28.7 % para 48 %). No mesmo período, a prevalência da obesidade aumentou em mais de quatro vezes para homens (de 2.8 % para 12.4 %) e em mais de duas vezes para mulheres (de 8.0 % para 16.9 %) (POF, 2010).

Como podemos notar, com base nos estudos mencionados anteriormente, o excesso de peso vem aumentando continuamente, em adultos, desde meados da década de 1970 e, atualmente o sobrepeso atinge aproximadamente a metade dos brasileiros. Se compararmos os resultados da POF 2008/2009 aos da POF 2002/2003, verificamos que nestes seis anos a frequência de pessoas com excesso de peso aumentou em mais de um ponto percentual ao ano. Com esta progressão em cerca de dez anos o excesso de peso poderá alcançar dois terços da população adulta do Brasil (67 %) (POF, 2010), magnitude semelhante à encontrada atualmente na população norte-americana.

Doenças Associadas à Obesidade

Estima-se que somente nos Estados Unidos a obesidade seja a causa de mais de 300.000 mortes anuais (Allison et al., 1999) e que, apenas no ano de 2008, o custo econômico total desta enfermidade tenha sido de U\$ 147 bilhões (Finkelstein et al., 2009). Dados internacionais indicam que a “epidemia” da obesidade não se restringe apenas aos Estados Unidos, mas que tem se tornado um problema de saúde global (Popkin 1998; IARC 2002) e, longe de ser um problema

meramente estético sabe-se hoje que o excesso de peso aumenta o risco de múltiplas condições, incluindo doenças cardiovasculares, morte súbita, câncer e diabetes *mellitus* do tipo 2 (USDHHS, 2001) causando aproximadamente 3 milhões de mortes por ano em todo o mundo (Ezzati et al., 2002; Ni Mhurchu et al., 2004; PSC 2009; WHO 2009).

Uma série de estudos tem relacionado obesidade a um aumento no risco de doenças cardíacas e estima-se que entre 20-30 % da mortalidade em decorrência de doenças cardiovasculares (CVD) sejam devido ao excesso de peso (Seidell et al., 1996). Homens e mulheres com excesso de peso ou obesos apresentam um risco de 2 a 3 vezes maior de desenvolver CVD quando comparados a indivíduos magros (Harris et al., 1993; Rimm et al., 1995). Corroborando estes resultados, o estudo de Framingham revelou que indivíduos obesos apresentam uma taxa 40 vezes mais alta de ter morte súbita (parada cardíaca não explicada) quando comparados com a população não obesa (Rabkin et al., 1977; Kannel et al., 1988). Estes dados são especialmente importantes uma vez que somente nos Estados Unidos as doenças do coração matam mais de 700.000 pessoas ao ano, sendo a maior causa de morte neste país (Anderson & Smith, 2003).

Adicionalmente, muitas evidências sugerem que adultos com excesso de peso ou obesos apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias (Wolin et al., 2010). A maior revisão literária nesse sentido - realizada em 2002 pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) - considerando peso, atividade física e incidência de câncer, concluiu que a obesidade era a causa de 11 % dos casos de câncer de cólon, 9 % dos casos de câncer de mama pós-menopausa, 39 % dos casos de câncer de endométrio, 25 % dos casos de câncer de rins e 37 % dos casos de câncer de esôfago (IARC, 2002). Além disso, dados da *American Cancer Society* sugerem que sobrepeso e obesidade estão diretamente relacionados com a mortalidade em casos de câncer de fígado, pâncreas, linfoma não Hodgkin e mieloma (Calle et al., 2003).

Obesidade e Diabetes Mellitus Tipo 2

Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), ou diabetes mellitus não insulino dependente (NIDDM), doença pertencente a um grupo de desordens metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia crônica (WHO, 2006), é a doença mais comumente associada à obesidade. Dentro deste grupo o DM2 é descrito como o tipo de diabetes que se inicia na vida adulta e tem como principais características a resistência à insulina, além de uma deficiência relativa na produção deste hormônio, quando comparado ao DM1, sendo este último caracterizado pela absoluta deficiência na produção da insulina (WHO, 2006). Em 2010 a prevalência global do diabetes foi de 284 milhões de pessoas, o que equivale a 6.4 % da população mundial. Uma projeção feita para o ano de 2030 prevê que a prevalência global dessa doença pode atingir cerca de 439 milhões de pessoas ou 7.7 % da população mundial (King et al., 1998; Rathmann & Giani, 2004; Shaw et al., 2010).

As prevalências de obesidade e diabetes têm aumentado em todo o planeta, em particular no último século, em virtude da adoção de um estilo de vida sedentário e da disseminação de uma dieta ocidentalizada (Zimmet et al., 2001) que se somam a predisposição genética de alguns indivíduos (Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Sladek et al., 2007; Zeggini et al., 2007/2008; Ling & Groop, 2009). Em 2010 o impacto econômico mundial do DM2 foi de U\$ 376 bilhões e estima-se que em 2030 seja de U\$ 490 bilhões (Farag & Gaballa, 2011). Esta enfermidade é de substancial importância para a Saúde Pública, não somente pelo impacto econômico, mas também devido à alta frequência de morbi-mortalidades associadas a ela (Amos, 1997). Segundo a Organização Mundial de Saúde o DM2 está entre as quatro principais causas de morte, por doença, no mundo (WHO, 2006), além de reduzir a qualidade de vida dos indivíduos que sofrem dessa doença devido a complicações como: retinopatia, nefropatia, doenças cardiovasculares, doenças vasculares periféricas, derrames e doenças periodontais (ECDCDM, 1997).

Alguns estudos têm demonstrado que nos últimos 25 anos a prevalência do diabetes dobrou nos Estados Unidos e multiplicou de 3 a 5 vezes em países como Índia, Indonésia, China, Coréia e Tailândia (Yoon et al., 2006). Acredita-se que um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 seja o excesso de peso e que 90 % dos casos dessa enfermidade sejam atribuídos ao sobrepeso (Hossain et al., 2007). Chan (1994), Colditz (1995) e seus colaboradores, há mais de uma década, afirmaram haver uma relação linear entre o IMC e o risco de desenvolver DM2, mostrando através de estudos que indivíduos obesos apresentam um risco dez vezes maior de desenvolver este tipo de diabetes quando comparado com indivíduos não obesos.

Recentemente e, em consonância com os resultados descritos anteriormente, um estudo realizado na China entre os anos de 2007-2008 com 46 239 indivíduos mostrou que a incidência do DM2 aumentou em proporção direta à idade e ao IMC (Yang et al., 2010). Outro exemplo que nos mostra a interação entre excesso de peso e o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 é o de um estudo desenvolvido, no início da década de 90, entre os índios Pima. Esse estudo verificou que os índios Pima que viviam no Estado do Arizona e faziam uma dieta rica em calorias e pouca atividade física eram muito obesos, com alta prevalência de DM2 (45.5 %). Já os índios Pima que viviam nas montanhas da região nordeste do México e que além de uma dieta com poucas calorias praticavam atividade física intensa, possuíam IMC próximo do ideal e uma prevalência de diabetes do tipo 2 semelhante a população geral do México (8.4 %) (Ravussin et al., 1994).

Obesidade, Diabetes Mellitus Tipo 2 e Resistência à Insulina

O conhecimento acerca da associação entre obesidade e diabetes data de algumas décadas e a base principal para esta conexão é a capacidade que a obesidade tem de gerar um fenômeno conhecido como “resistência à insulina” (Kahn e Flier, 2000; Stumvoll et al., 2008). O termo resistência à insulina diz respeito a uma diminuição da sensibilidade à insulina por parte dos

principais tecidos alvos da ação desse hormônio. Tal fenômeno é medido pela perda da capacidade da insulina em estimular a captação, metabolismo e estoque da glicose pelos tecidos periféricos (fígado, músculo e tecido adiposo) e assim diminuir a concentração desse carboidrato na corrente sangüínea (Ma & Chan, 2009). Diversos estudos têm demonstrado que em obesidade e DM2 a resistência à insulina é caracterizada pela diminuição no transporte e metabolismo da glicose, estimulados pela insulina, e também pelo prejuízo da supressão hepática de glicose (Reaven, 1995; Ma & Chan, 2009). Alguns estudos longitudinais descrevem o acompanhamento da glicemia e insulinemia em pessoas obesas que progrediram da normoglicemia à intolerância à glicose (IGT) e finalmente para o diabetes mellitus do tipo 2 (DeFronzo, 1992; Mitrakou et al., 1992). Tais estudos verificaram que ainda que normoglicêmicos grande parte dos indivíduos obesos apresentava resistência à insulina e que esta resistência se tornou pior em situação de IGT. Dessa maneira foi possível concluir que a resistência à insulina precede em muitos anos a falha das células β e conseqüentemente o DM2 (De Fronzo, 1992).

Como já mencionado anteriormente a resistência à insulina está presente e precede o desenvolvimento do DM2 na maioria dos pacientes (Stern, 1997). Tal condição pode estar relacionada estritamente a anormalidades genéticas em alguns poucos indivíduos, mas em geral a resistência à insulina está associada à obesidade, em particular a obesidade central ou visceral (Lemieux et al., 1996). Na verdade nem todos os obesos, resistentes à insulina, desenvolvem hiperglicemia, pois as células β pancreáticas aumentam a secreção de insulina para sobrepor à eficiência reduzida da ação deste hormônio sobre os tecidos alvos, mantendo assim a tolerância normal à glicose (Perley & Kipniz, 1966; Polonski et al., 1988; Kahn et al., 1993). Porém algumas publicações têm considerado a obesidade visceral como um poderoso preditor do desenvolvimento de DM2 em ambos os sexos (Carey et al., 1997; Unwin et al., 1997; Boyko et al., 2000; Wat et al.,

2001; Wang et al., 2005), uma vez que para sobrepor a resistência à insulina, característica deste tipo de obesidade, é necessário maior síntese e secreção deste hormônio. O aumento exagerado na demanda secretória de insulina em indivíduos obesos, para compensar tal resistência, pode levar a falência das células β e, conseqüente insuficiência na produção e secreção deste hormônio levando ao desenvolvimento do DM2 (Kahn, 2001).

A obesidade como característica predisponente para o surgimento da resistência à insulina é o principal fator de risco para o desenvolvimento de DM2. Isso se dá porque o excesso de tecido adiposo, principalmente o visceral, modula o metabolismo corpóreo por liberar em excesso e, na corrente sangüínea, ácidos graxos não esterificados (NEFAs), glicerol, hormônios (leptina, adiponectina) e citocinas pró-inflamatórias (Wellen & Hotamisligil, 2005; Scherer, 2006; Shoelson et al., 2006), muitos dos quais agindo sobre tecidos alvos da ação da insulina podem desencadear mecanismos moleculares capazes de gerar resistência central e periférica à ação desse hormônio e em grande parte dos casos levar ao desenvolvimento do DM2.

Estudos recentes têm demonstrado que os adipócitos produzem $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6 , IL8 , PAI-I, MCP1 e outras proteínas que estimulam as vias da JNK, $\text{NF}\kappa\text{B}$ e também o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, resultando numa regulação positiva de mediadores inflamatórios os quais contribuem para a resistência à insulina (Fain et al., 2004; Kahn et al., 2005; Wellen & Hotamisligil, 2005; Ma & Chan, 2009). Outro fator crítico capaz de modular a sensibilidade à insulina é a liberação de NEFAs pelo tecido adiposo. Durante o jejum o tecido adiposo branco é a principal fonte de NEFAs, os quais servem de substrato energético para músculo e fígado. Porém a lipólise exagerada, durante o estado absorptivo, induz a lipotoxicidade – deposição de triglicérides em tecidos que não no tecido adiposo branco – e a uma inflamação subclínica, que é comumente associada à obesidade e ao diabetes (Boden, 2006). Altas concentrações desses ácidos graxos, em indivíduos

com obesidade e/ou DM2, são associadas com a resistência à insulina encontrada em ambas as enfermidades (Reaven et al., 1988; Boden, 1997). Uma concentração intracelular elevada de NEFAS pode competir com a glicose pela oxidação e assim o faz pela inibição da atividade de algumas enzimas (piruvato desidrogenase, fosfofrutoquinase e hexoquinase II) diretamente relacionadas com a oxidação deste carboidrato (Randle et al., 1963). Além disso, o excesso de NEFAs intracelular pode aumentar a concentração de metabólitos de ácidos graxos como: diacilglicerol (DAG), Acil-coenzima A (FACoA) e ceramidas, que por sua vez ativam uma cascata de serina-treonina quinases que podem levar a fosforilação em serina dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS1/2), reduzindo dessa maneira a capacidade destas moléculas em ativar a PI3K (Shulman, 2000) o que em última análise implica na redução da sinalização da insulina.

Resistência à Insulina no Tecido Muscular Esquelético

Um dos principais tecidos que controlam a homeostase da glicose é o músculo estriado esquelético. Em nosso organismo este tecido é responsável por cerca de 80 % da captação total de glicose estimulada pela insulina (DeFronzo et al., 1981; Shulman et al., 1990), de maneira que a resistência à insulina em músculo esquelético é substancial para que ocorra a hiperglicemia e conseqüentemente o desenvolvimento de DM2 (Furber et al., 2001). Há muitas evidências mostrando que a deposição ectópica de triglicérides em tecidos periféricos, especialmente em músculo esquelético, contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (Unger, 2003). Ainda nesse sentido Goodpaster e colaboradores (1997) sugeriram que a concentração de lipídios intramuscular é melhor preditor da resistência à insulina do que a adiposidade em si. Estudos realizados com roedores mostraram que a resistência à insulina se desenvolve após poucas semanas de ingestão de uma dieta rica em gordura e que tal fenômeno se associa diretamente ao acúmulo de

triacilglicerol intramuscular (Kraegen et al., 1991; Storlien et al., 1991; Kim et al., 1996; Oakes et al., 1997; Dobbins et al., 2001).

Sistema Nervoso Central e Homeostase da Glicose

A descoberta da insulina, em 1921, e a subsequente caracterização de sua importância fisiológica sobre tecidos como: fígado, músculo e tecido adiposo, fizeram com que muitos estudiosos trabalhassem sobre a hipótese de que a regulação anormal do metabolismo da glicose, em obesidade e DM2, ocorresse primariamente por causa de uma falha da ação da insulina sobre os tecidos periféricos anteriormente mencionados. Sendo assim muitos esforços focaram na descoberta de medicamentos que pudessem melhorar a sensibilidade à insulina nestes tecidos (Sandoval et al., 2009). Ainda que seja inegável a participação dos tecidos periféricos sobre a homeostase da glicose atualmente está claro que o sistema nervoso central (SNC) também apresenta uma função importante em orquestrar de maneira apropriada o metabolismo da glicose e, um desequilíbrio neste sistema poderia levar a falhas nos mecanismos glicoregulatórios.

Há muitas evidências mostrando que há sobreposições entre os circuitos no SNC responsáveis pela homeostase energética e glicêmica, sugerindo que um desequilíbrio entre eles pode associar obesidade e diabetes (Sandoval, 2009). Já na metade do século XIX o fisiologista Claude Bernard sugeriu que o SNC era responsável por regular a homeostase da glicose através de um balanço entre nervos antagonistas que estimulavam a produção ou a captação de glicose (Bernard, 1854). Há mais de um século, o renomado fisiologista francês observou que o diabetes poderia ser induzido em animais pela lesão do quarto ventrículo cerebral (Bernard, 1854). Já nesta época Bernard previu que um completo entendimento da patogênese do DM2 deveria considerar o SNC como um regulador central do metabolismo (Schwartz & Porte Jr., 2005).

Desde a descoberta de Claude Bernard, em 1854, muitos outros estudos surgiram mostrando que o SNC pode modular direta e indiretamente os três principais reguladores da homeostase da glicose: pâncreas, fígado e músculo esquelético. Sabe-se que a denervação específica de nervos eferentes viscerais bloqueiam a capacidade do SNC em regular a produção hepática da glicose (HGP) em resposta a nutrientes e hormônios (Obici et al., 2002; Lam et al., 2005; Pocai et al., 2005), sugerindo assim uma importante função para estes nervos no controle hepático da produção de glicose. Além disso, a lesão de neurônios motores e vasculares, que inervam o músculo estriado esquelético, é capaz de modular a concentração de glicogênio neste tecido (Knauf et al., 2005). O pâncreas é outro órgão que recebe inervações neurais, principalmente do sistema nervoso autônomo (SNSA), que regulam a secreção de insulina e glucagon pancreáticos (Cherrington, 1999) e dessa maneira a homeostase da glicose.

No SNC o hipotálamo é considerado um órgão integrador, ou seja, capaz de perceber os sinais do ambiente dado por hormônios e nutrientes e elaborar respostas para manter a homeostase energética do organismo. Anos depois dos trabalhos de Claude Bernard alguns pesquisadores mostraram que lesões na área hipotalâmica lateral (HL) conduziam a hipofagia e a magreza (Anand & Brobeck, 1951) enquanto que lesões no hipotálamo ventromedial (VMN ou VMH) de ratos levava a hiperfagia, ganho de peso e hiperinsulinemia (Hetherington & Ranson, 1940; Inoue et al., 1978; Berthoud & Jeanrenaud, 1979; Fukushima et al., 1987), sugerindo assim que a homeostase da glicose é controlada por núcleos hipotalâmicos. Ainda na década de 50 Kennedy sugeriu que possivelmente a adiposidade corpórea era controlada por “fatores circulantes” que, liberados em proporção a massa adiposa, agiriam no cérebro controlando assim a homeostase energética (Kennedy, 1953). Dentre os “fatores circulantes” mencionados anteriormente os mais amplamente estudados atualmente são: insulina e leptina. Ambos os hormônios em questão circulam em

concentrações proporcionais a massa adiposa (Bagdade et al., 1967; Considine et al., 1996) e interagem com seus respectivos receptores, no hipotálamo, para modular a ingestão calórica e o gasto energético (Baskin et al., 1988, 1999). Evidências recentes sugerem que, além de modular a homeostase energética estes hormônios também tenham função crucial no controle hipotalâmico do metabolismo da glicose (Morton, 2007).

Ações Periféricas e Centrais da Insulina sobre a Homeostase da Glicose

A insulina é o mais potente hormônio anabólico que se conhece (Saltiel e Pessin, 2002). Produzido pelas células β pancreáticas este hormônio é secretado, em resposta às refeições, e em proporção a concentração circulante de glicose e aminoácidos. Ela age sobre receptores celulares específicos e é fundamental para a homeostase da glicose, crescimento e diferenciação celular. Como já descrito, extensivamente pela literatura, a insulina age sobre órgãos periféricos e modula o metabolismo da glicose por reduzir a produção hepática de glicose (inibe a gliconeogênese e a glicogenólise) e aumentar a captação desse carboidrato, principalmente pelo músculo esquelético e tecido adiposo branco. Ainda, a insulina estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação de proteínas (Carvalho et al. 2002).

Além dos efeitos desencadeados em tecidos periféricos a insulina atua sobre áreas cerebrais – envolvidas no controle da homeostase energética e metabolismo da glicose – e as informa acerca da disponibilidade dos estoques energéticos do corpo (Obici & Rossetti, 2003; Flier, 2004; Schwartz & Porte Jr., 2005). Agindo através de receptores específicos – presentes em áreas hipotalâmicas como o núcleo arqueado (ARC) (Schwartz et al., 1992) – a insulina inibe a fome, promovendo assim um balanço energético negativo (Woods et al., 1979) e reduz a glicemia, por inibir a produção hepática de glicose (Obici et al., 2002). Além do ARC, o núcleo hipotalâmico ventromedial (VMN ou VMH) também é responsável pelo controle fisiológico do balanço energético e

metabolismo da glicose (Morton, 2007). Já na década de 1980 Szabo e colaboradores mostraram que a micro-injeção de insulina no VMH reduzia a concentração sérica de glicose por um mecanismo autonômico envolvendo o nervo vago (Iguchi et al. 1981). A importância da função fisiológica da ação hipotalâmica da insulina provém da constatação de que camundongos *knockout* para receptores de insulina em determinados neurônios (Bruning et al., 2000) são obesos e resistentes à insulina, características estas acompanhadas pela hiperfagia e aumento na produção hepática da glicose (Obici et al., 2002).

Pocai e colaboradores (2005) mostraram em estudos recentes que a capacidade que a insulina tem de reduzir a HGP em ratos normais requer a atuação deste hormônio sobre o hipotálamo mediobasal. Isto torna este órgão um sítio extra-hepático da ação da insulina fundamental para a regulação da HGP. Outros pesquisadores demonstraram que a supressão da HGP e também a melhora da sensibilidade à insulina por tecidos periféricos dependem da ativação hipotalâmica, estimulada pela insulina, da via de sinalização IRS/PI3K/AKT (Fig. 03A) (Obici et al., 2002; Gelling et al., 2006; Plum et al., 2006), uma vez que a inibição da PI3K no hipotálamo reduziu em 38 % a resposta glicêmica em animais diabéticos que receberam tratamento diário com insulina (Gelling et al., 2006). Acredita-se que a ativação desta via no hipotálamo seja determinante no controle glicêmico de animais com diabetes não controlado pelo tratamento com insulina sistêmica, de maneira que estratégias que tenham como alvo a via de transdução de sinal da insulina no hipotálamo, podem revelar muitos benefícios no controle do diabetes em humanos (Gelling, 2006).

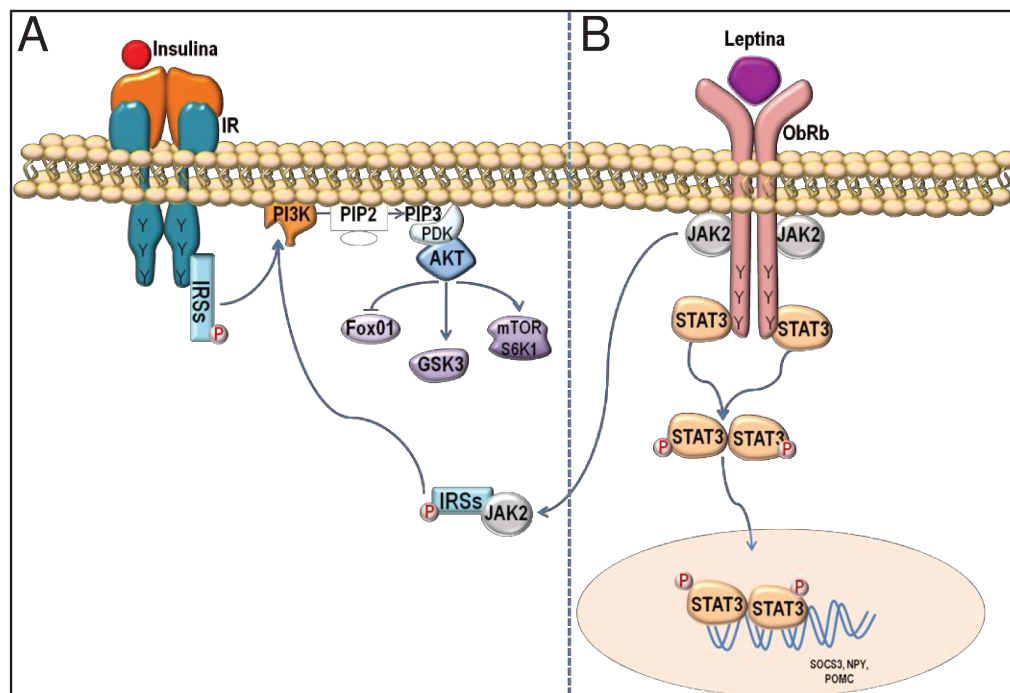


Fig. 03 – Sinalização da Insulina (A) – A insulina se associa ao seu receptor (IR), que se auto-fosforila em resíduos de tirosina, os quais quando fosforilados se constituem sítios de ligação para proteínas como os substratos do receptor de insulina (IRSs). Estes substratos são então fosforilados, se associam e ativam proteínas que contêm domínios SH2 como a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Tais eventos resultam na fosforilação, ativação ou inativação de proteínas envolvidas no transporte de glicose, síntese de glicogênio, lipídios e proteínas; **Sinalização da Leptina (B)** – A leptina se associa ao receptor ObRb e induz sua dimerização estimulando a ativação da proteína Janus quinase, JAK2, a qual fosforila o receptor, além de fosforilar e ativar o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), que fosforilado se dimeriza e transloca-se para o núcleo para modular a transcrição de genes, dentre eles os da Proteína Supressora da Sinalização das Citocinas 3 (SOCS3), do Neuropeptídeo Y (NPY) e do Pro-opiomelanocortina (POMC); **Cross-talk entre as vias da insulina e leptina (AB)** – A leptina é capaz de ativar também a PI3K, componente importante na transdução do sinal da insulina, pela interação da JAK2 com os substratos do receptor de insulina (IRSs).

A Biologia da Leptina

Além da insulina, a leptina desempenha um papel muito importante na regulação central do metabolismo da glicose. Através da técnica de clonagem posicional Zhang e colaboradores descobriram, no início da década de 1990, um gene do camundongo *ob/ob*, que apresentava uma mutação tal que conferia a estes animais um fenótipo de completa deficiência do produto do gene *ob* (Zhang et al., 1994). O produto deste gene foi denominado leptina, de raiz grega *leptos* significa magro (Halaas et al., 1995). A leptina é uma adipocina prototípica de 167 aminoácidos, formada por quatro hélices características das citocinas (Zhang et al., 1997; Brennan & Mantzoros, 2006). Este hormônio de 16 kDa (Zhang et al., 1994) é produzido primariamente pelo tecido adiposo branco, mas pode ser expresso também por tecidos como a placenta, ovários, epitélio mamário, medula óssea

(Margetic et al., 2002) e tecidos linfóides (Matarese et al., 2005). No ser humano as concentrações de leptina sérica variam de forma pulsátil e seguem um ritmo circadiano, atingindo maiores concentrações entre a meia noite e o início da manhã e as menores concentrações entre o início da manhã e o meio dia (Sinha et al., 1996; Blüher & Mantzoros, 2009; Licinio et al., 2009). A concentração de leptina circulante é diretamente proporcional a quantidade de tecido adiposo branco do indivíduo (Considine et al., 1996), sendo que a gordura subcutânea expressa mais leptina do que a omental, o que explica parcialmente a maior concentração desse hormônio em mulheres, quando comparado aos homens (Montague et al., 1997; Saad et al., 1997).

A leptina desencadeia seus efeitos através de ligação a receptores específicos do tipo ObRs, os quais pertencem a família dos receptores de citocina de classe I (Tartaglia et al., 1995). Tais receptores se encontram espalhados pelo sistema nervoso central e tecidos periféricos como músculo, fígado e tecido adiposo (Fei et al., 1997). Até o momento foram identificados 6 isoformas do receptor de leptina (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe, ObRf) (Lee et al., 1996), sendo que todas estas isoformas apresentam domínio extracelular idêntico, porém domínio intracelular distinto, que varia no comprimento e na seqüência de aminoácidos devido ao *splicing* alternativo do RNAm (Lee et al., 1996; Tartaglia, 1997). A isoforma longa do receptor de leptina (ObRb) é a isoforma considerada funcional, pois é ela a responsável pela sinalização desse hormônio (Lee et al., 1996; Tartaglia, 1997; Bjørbaek et al., 1998).

Principal Via de Sinalização da Leptina – JAK/STAT

A ativação do ObRb pela leptina desencadeia uma cascata formada por diversas vias de transdução de sinal, das quais a melhor estudada é a via JAK2/STAT3 (Fig. 03B) (Gao et al., 2008). O ObRb bem como os demais membros da família de receptores de citocina da classe I não apresentam atividade catalítica intrínseca, dessa maneira tais receptores são constitutivamente

ligados a uma proteína citosólica com atividade tirosina quinase, a Janus quinase – 2 (JAK2) (Bjørbaek et al., 1997). A ação da leptina sobre uma das subunidades do receptor de leptina estimula a dimerização transitória deste receptor (Zabeau et al., 2003), o qual pela mudança conformacional estimula a atividade catalítica da enzima JAK2. Uma vez ativa a JAK2 se autofosforila, em resíduos de tirosina, e fosforila a JAK2 adjacente à segunda subunidade do receptor de leptina (Tartaglia, 1997). Estas enzimas fosforiladas e ativas fosforilam o receptor de leptina nos seguintes resíduos de tirosina: Tyr985, Tyr1077 e Tyr1138, os quais fosforilados servem de sítios de ligação para moléculas sinalizadoras (Li & Friedman, 1999; Banks et al., 2000; Hekerman et al., 2005). Em especial a tirosina 1138 quando fosforilada se torna um sítio de ancoragem para moléculas da família dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), particularmente a STAT3 (Bjørbaek & Kahn, 2004) hipotalâmica (Vaisse et al., 1996; McCowen et al., 1998) nas regiões do ARC, LH, VMN e DMN (Hübschle et al., 2001). A STAT3 fosforilada se dimeriza e transloca-se para o núcleo onde é capaz de regular a expressão de muitos genes alvos, dentre eles a transcrição de genes de neurotransmissores responsivos ao sinal hormonal (Bjørbaek & Kahn, 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que a leptina tem efeitos pleiotrópicos que compreendem: regulação do metabolismo energético (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995), homeostase da glicose (Schwartz et al., 1996; Barzilai et al., 1997; Liu et al., 1998; Chinookoswong et al., 1999; Coppari et al., 2005; Morton et al., 2005), metabolismo de lipídios (Frederich et al., 1995; Mantzoros et al., 1998; Unger et al., 1999), função reprodutiva (Chehab et al., 1996) e função imune (Lord et al., 1998; Brennan & Mantzoros, 2006; Mansour et al., 2006; Papathanassoglou et al., 2006; Girasol et al., 2009), porém acredita-se que uma das funções mais importantes desse hormônio seja a de modular a homeostase energética do organismo a partir de sua ação no hipotálamo.

Ação da Leptina sobre a Homeostase Energética

A leptina mantém a homeostase energética por ajustar a ingestão calórica ao gasto energético e assim o faz por agir, sobretudo em vias neuronais dentro e fora do hipotálamo (Dardeno et al., 2010). Sabe-se que o núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico é uma região crítica de ação da leptina. O ARC se localiza adjacente ao 3º ventrículo e imediatamente acima da eminência média, região onde a barreira hematoencefálica é especialmente modificada para permitir a passagem de peptídeos periféricos (ex.: leptina, insulina) para que dessa maneira tais peptídeos tenham acesso aos seus receptores (Arora & Anubhuti, 2006). A leptina, por meio do receptor de forma longa ObRb, age sobre duas populações neuronais presentes no ARC hipotalâmico: POMC/CART e NPY/AgRP (Cowley et al., 2001; Morrison, 2009), os chamados neurônios de primeira ordem (Fig. 04). Agindo sobre os neurônios POMC a leptina estimula a produção de α -MSH e CART, neuropeptídeos anorexigênicos que diminuem a ingestão alimentar (Cowley et al., 2001; Myers et al., 2008; Rogge et al., 2008). Recentemente alguns pesquisadores demonstraram que a deleção específica de receptores de leptina (ObRb) em neurônios POMC levam a hiperfagia moderada e obesidade, em camundongos (Balthasar et al., 2004; Myers et al., 2008). Paralelamente a ativação dos neurônios POMC, a leptina é capaz de inibir a atividade dos neurônios NPY/AgRP, os quais coexpressam neuropeptídeos orexigênicos, capazes de aumentar a ingestão alimentar (Cowley et al., 2001) e reduzir o gasto energético (Stanley & Leibowitz 1984; Gao & Horvath, 2008).

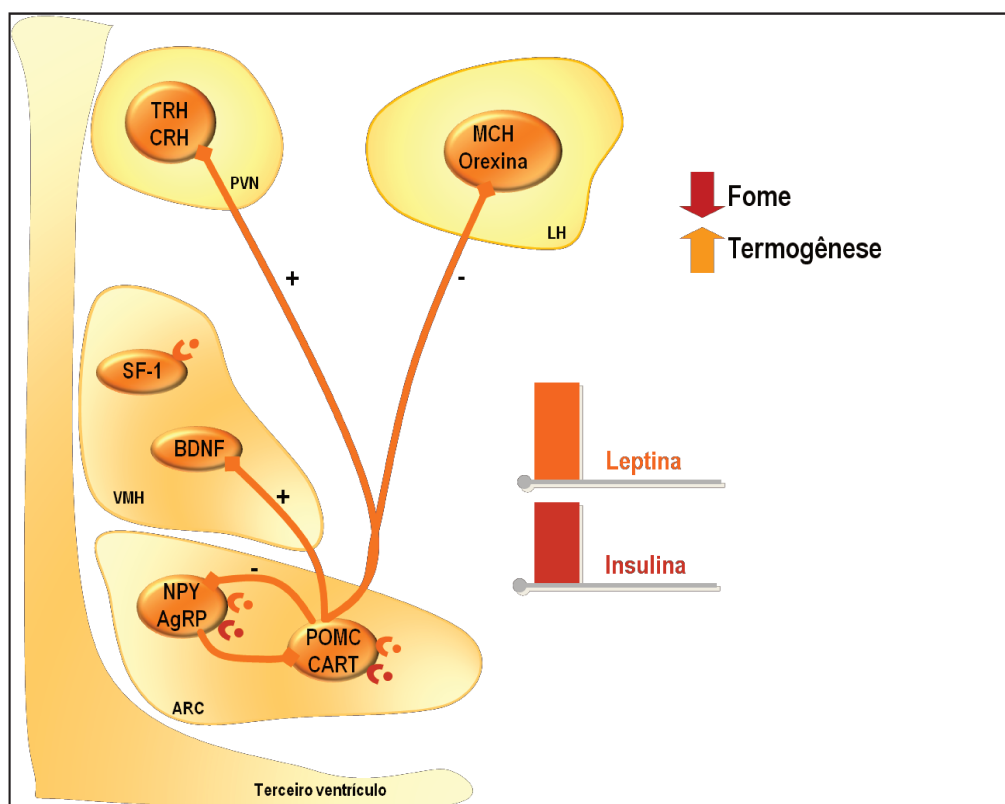


Fig. 04 – Ação da Leptina sobre o hipotálamo – Tanto a insulina quanto a leptina são secretadas, na corrente sanguínea, em concentrações proporcionais ao tecido adiposo branco e são capazes de interagir, através de seus receptores, com neurônios do Núcleo Arqueado (ARC) e Hipotálamo Ventromedial (VMH). No ARC, a Insulina e a leptina ativam os neurônios pro-opiomelanocortina (POMC) estimulando a liberação do hormônio estimulador α -melanocítico (α -MSH), o qual ativa os neurônios de segunda ordem no Núcleo Paraventricular (PVN) e inibe os neurônios do Hipotálamo Lateral (HL) resultando na redução da ingestão alimentar e no aumento do gasto energético. Agindo sobre o VMH a leptina estimula a produção do fator esteroideogênico-1 (SF-1) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) os quais reduzem a ingestão alimentar. Por outro lado os neurônios orexigênicos que co-expressam neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao Agouti (AgRP), são inibidos por insulina e leptina o que contribui para a redução da ingestão alimentar.

Acredita-se que a via JAK2/STAT3 desempenhe importante função nos efeitos decorrentes da ação central da leptina sobre a homeostase energética. Alguns estudos têm demonstrado que a ativação da STAT3, por este hormônio, induz a transcrição de POMC no ARC hipotalâmico (Caldefie-Chezet et al., 2003). Bates e colaboradores (2003) demonstraram que animais homozigotos para uma mutação na Tyr1138 do ObRb (s/s) – mutação esta que impede a ligação da STAT3 ao ObRb e conseqüentemente a transdução do sinal da leptina – são hiperfágicos e obesos como os camundongos *db/db* (Bates et al., 2003), porém diferente destes os animais s/s não apresentam hiperglicemia (Bates et al., 2005). Corroborando estes estudos Gao et al. (2004) mostraram que a deleção do gene de STAT3 em neurônios de camundongos promoveu uma

diminuição na expressão de POMC no ARC gerando hiperfagia, obesidade e diabetes nestes animais (Gao et al., 2004). Além de ativar os neurônios POMC, a via JAK2/STAT3 suprime, em menor magnitude, os neurônios NPY/AgRP em neurônios do ARC, os quais são responsáveis pela produção de neuropeptídeos orexigênicos (Bates et al., 2003; Gong et al., 2008). Segundo Gong e colaboradores (2008) a deleção de STAT3 em neurônios NPY/AgRP de camundongos resultou em hiperleptinemia, hiperfagia, hiperinsulinemia induzida pela dieta rica em gordura e um ganho de peso moderado. Estes camundongos apresentaram ainda um aumento na expressão de NPY, embora o mesmo efeito não tenha acontecido para AgRP (Bates et al., 2003; Gong et al., 2008). É provável que outras vias contribuam para ação da leptina, em neurônios NPY/AgRP, já que estes foram apropriadamente suprimidos pela ação da leptina em camundongos homozigotos para a mutação em Tyr1138 (s/s) (Münzberg et al., 2007).

O ARC não é a única região hipotalâmica envolvida no controle da homeostase energética pela leptina. Outra região que contém receptores ObRb para a ação deste hormônio e mesmo projeções excitatórias vindas de neurônios POMC é o hipotálamo ventromedial (VMH) (Sternenson et al., 2005). Acredita-se que este seja um local chave para a ação direta e/ou indireta desse hormônio, pois a leptina é capaz de estimular a secreção de dois neuropeptídeos anorexigênicos nesta região: o SF-1 e o BDNF (Dhillon et al., 2006; Gao & Horvath, 2008). Dhillon e colaboradores demonstraram que a ausência de receptores ObRb em neurônios SF-1 são marcadamente hiperfágicos e obesos (Dhillon et al., 2006) e que a deleção do gene de BDNF resulta em camundongos obesos e hiperleptinêmicos (Rios et al., 2001).

Outros núcleos hipotalâmicos, influenciados direta e/ou indiretamente pela ação da leptina, e envolvidos na homeostase energética são: núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (LHA). Estas áreas recebem projeções do ARC que contribuem para a regulação da ingestão

alimentar e peso corpóreo (Arora & Anubhuti, 2006; Smith & Ferguson, 2008; Tung et al., 2008). No PVN a leptina, via projeções dos neurônios do ARC, estimula a expressão de TRH (pró-termogênico) (Légrádi et al., 1997; Flier, 2004) e CRH (anorexigênico) (Costa et al., 1997; Schwartz et al., 2000) ao passo que no LHA, a leptina, via projeções dos neurônios do ARC, inibe a expressão de MCH (anti-termogênico) e orexina (orexigênico) (Fig. 04) (Schwartz et al., 2000; Pereira-da-Silva et al., 2003; Flier, 2004), diminuindo assim a ingestão calórica e aumentando o gasto energético. Adicionalmente a regulação da homeostase energética pelo controle da ingestão alimentar, a leptina regula o gasto energético pela ativação do sistema adrenérgico (Mantzoros et al., 1996) e da melanocortina (Pierroz et al., 2002). Em roedores, a leptina aumenta o tônus adrenérgico do sistema nervoso simpático (SNS) para o tecido adiposo marrom, o que contribui para um aumento na taxa metabólica e na temperatura (Collins et al., 1996). Além disso, a leptina aumenta o consumo de oxigênio e a expressão de UCP1, fundamentais para a termogênese que ocorre neste tecido (Scarpace et al., 1997).

Ação Periférica da Leptina sobre a Homeostase da Glicose

Outra função bastante importante da leptina é a de controlar a homeostase da glicose prevenindo a lipotoxicidade e conseqüentemente protegendo o organismo contra a resistência à sinalização da insulina. Alguns estudos têm demonstrado que agindo diretamente sobre o músculo estriado esquelético a leptina aumenta a captação e a taxa de oxidação de glicose – estimulados pela insulina (Ceddia et al., 1999) – além de aumentar a atividade do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH) e do ciclo de Krebs (Ceddia et al., 1999). Sabe-se que a leptina estimula ainda o desacoplamento mitocondrial e aumenta o consumo de O₂, e isto cursa com uma diminuição na razão ATP/ADP que, acredita-se seja um dos motivos responsáveis pela ativação da enzima PDH e também de algumas enzimas do ciclo de Krebs (Curi et al., 1988).

Os mecanismos pelos quais a leptina afeta diretamente o metabolismo da glicose e de lipídios em músculo esquelético não estão completamente esclarecidos, mas parece que o *cross-talk* entre as vias de sinalização da insulina e da leptina na altura dos substratos do receptor de insulina (IRSs) e da enzima PI3K é substancial (Kellerer et al., 1997; Bjørbaek & Kahn, 2004). De acordo com alguns estudos a leptina é capaz de ativar a enzima quinase JAK2, que por sua vez fosforila e ativa o IRS2, que se associa e ativa a PI3K e isto é acompanhado por um aumento na captação de glicose em células musculares C₂C₁₂ (Fig. 03AB) (Berti et al., 1997; Kellerer et al., 1997).

Foram publicados diversos trabalhos mostrando que a leptina também é capaz de ativar a enzima quinase ativada por 5'-AMP (AMPK) (Minokoshi et al., 2002; Minokoshi & Kahn, 2003). Esta enzima funciona de maneira a regular o metabolismo celular em resposta a mudanças no estado energético das células (Winder, 2001). A AMPK é ativada em situações nas quais ocorre uma diminuição na razão ATP/AMP e atua inibindo vias anabólicas e estimulando vias catabólicas através da fosforilação de enzimas chaves pertencentes ao metabolismo intermediário (Winder, 2001). Estudos têm sugerido que possivelmente a AMPK seja uma das principais responsáveis pelo aumento da captação de glicose, em músculo esquelético, induzida pela contração ou mesmo pela hipóxia. Dessa maneira, as observações de que a leptina aumenta a captação e o metabolismo da glicose *in vitro* (Berti et al., 1997; Harris, 1998; Ceddia et al., 1999; Bates et al., 2002) e *in vivo* (Kamohara et al., 1997; Ceddia et al., 1999) em músculo esquelético podem ser, pelo menos parcialmente, explicadas pela ativação da AMPK por esse hormônio.

Por outro lado a leptina contribui para uma melhora na sensibilidade à insulina na medida em que ao estimular a ativação da AMPK em músculo esquelético, esta enzima fosforila e inativa a enzima acetil CoA carboxilase (ACC). Nesta condição a síntese de malonil-CoA é inibida e a oxidação de ácidos graxos é favorecida (Winder, 2001; Munday, 2002; Carling et al., 2003; Winder et

al., 2003; Unger, 2003), desde que o malonil-CoA é um inibidor da enzima mitocondrial carnitina palmitoil-CoA transferase (CPT-1) (Fig. 05) (McGarry, 2002; Boden, 2003). Tais eventos são fundamentais para a melhora na sensibilidade à insulina já que o excesso de ácidos graxos intracelular causa um aumento nas razões intramitocondriais de Acetil-CoA/CoA e NADH/NAD⁺, com subsequente inativação da piruvato desidrogenase (Randle et al., 1963) e aumento nas concentrações de citrato que inibe a fosfofrutoquinase, enzima chave para o controle da glicólise. Estes eventos levariam a um acúmulo de glicose-6-fosfato e a inibição da atividade da hexoquinase-II, causando um aumento na concentração de glicose intracelular e conseqüentemente uma diminuição pronunciada da captação desse carboidrato (Randle et al., 1963). Além disso, o excesso de ácidos graxos pode levar a geração de metabólitos como diacilgliceróis os quais podem ativar serinas-treoninas quinases que fosforilam em serina os IRSs (Griffin et al., 1999; Yu et al., 2002) que assim fosforilados são incapazes de se associar à PI3K resultando numa diminuição do transporte da glicose e em última análise à resistência à insulina (Kahn & Flier, 2000; Roden, 2004).

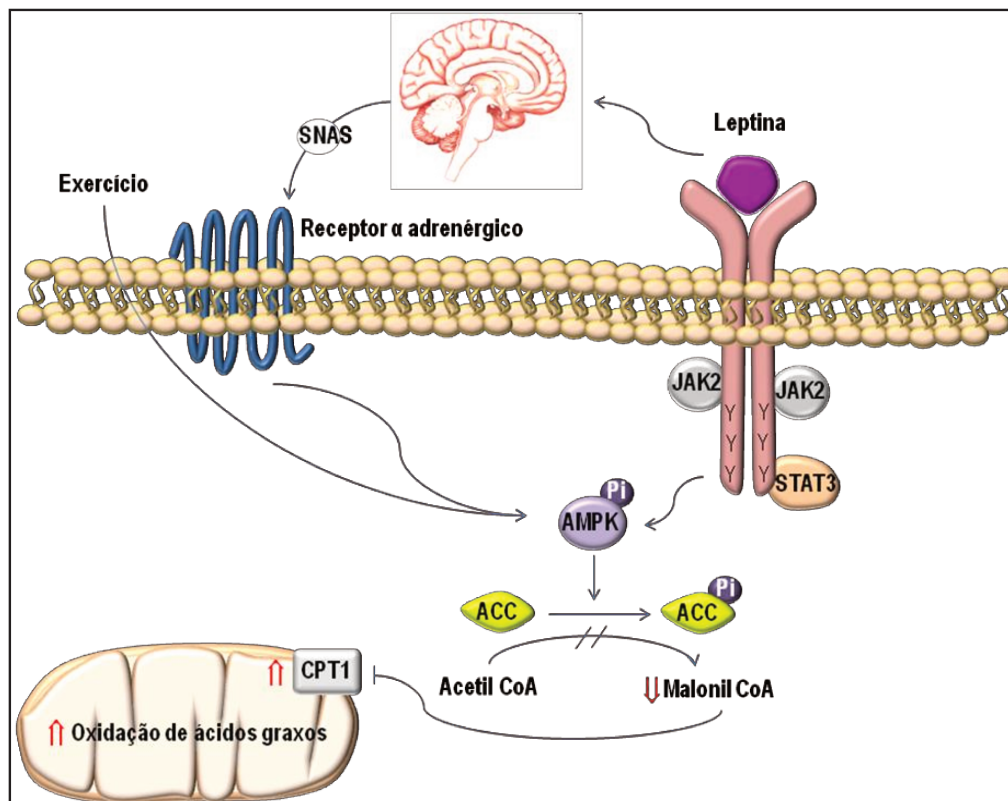


Fig. 05 – Via da AMPK/ACC – Exercício e adipocinas (leptina e adiponectina) induzem a ativação da quinase ativada por 5'AMP (AMPK), que por sua vez fosforila e inibe a atividade da acetil CoA-Carboxilase (ACC). Isto reduz a síntese de malonil-CoA, ativando a carnitina palmitoil-CoA transferase (CPT1) e aumenta a translocação e oxidação de ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para o interior da mitocôndria. A leptina ativa a AMPK no músculo através de dois mecanismos distintos: i) Efeito direto da leptina através do seu receptor (ObRb); ii) Ação indireta da leptina mediada pelo sistema nervoso simpático (SNAS) o qual induz a ativação de receptores α-adrenérgicos (Adaptado de Minokoshi et al., 2002).

Ação Central da Leptina sobre a Homeostase da Glicose

Muitas evidências têm sugerido que além de regular a homeostase glicêmica, indiretamente, por controlar o balanço energético e assim a adiposidade, a leptina pode regular a homeostase da glicose agindo diretamente sobre o SNC (Bates et al., 2005). Modelos de animais com deficiência genética na produção de leptina (camundongos *ob/ob* ou lipodistróficos) são caracterizados por severa resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (Zhang et al., 1994; Shimomura et al., 1999), e o tratamento com leptina melhora estas condições por um mecanismo que envolve o SNC, porém que não pode ser explicado simplesmente por mudanças na ingestão alimentar (Schwartz et al., 1996; Shimomura et al., 1999; Asilmaz et al., 2004) e/ou pela mudança no peso corpóreo (Pelleymounter et al., 1995; Schwartz et al., 1996; Farooqi et al., 1999; Yu et al., 2008). Asilmaz e colaboradores

(2004) mostraram que a administração de leptina no 3° ventrículo – em baixas concentrações e ineficazes quando administradas periféricamente – reverte o fenótipo caracterizado pela resistência à insulina e diabetes em camundongos lipodistróficos.

Recentemente Morton e colaboradores (2007) publicaram um trabalho mostrando que a restauração da sinalização da leptina no núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico de ratos Koletsky (fa^k/fa^k) melhora a sensibilidade à insulina por um mecanismo, ao menos em parte, independente da ingestão alimentar e do peso corpóreo. Corroborando os estudos anteriores Coppari e colaboradores (2005) relataram uma melhora surpreendente na homeostase da glicose em camundongos com completa deficiência no receptor de leptina, cuja via de sinalização desse hormônio foi seletivamente restaurada no ARC. Entretanto, o mesmo efeito não foi verificado quando a restauração deste receptor foi feita em LH ou VMH, ainda que com redução do peso corpóreo. Dessa maneira a via intacta de sinalização da leptina em neurônios do núcleo arqueado no hipotálamo parece ser bastante importante para a manutenção normal da sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica (Coppari et al., 2005).

O controle glicêmico efetuado pela ação central da leptina parece ocorrer principalmente por dois motivos: pela inibição da produção hepática de glicose (HGP) e pelo estímulo da captação da glicose por tecidos periféricos, dentre eles o músculo estriado esquelético. Em 2009, German e colaboradores mostraram que a restauração do receptor de leptina no ARC, em ratos Koletsky, foi capaz de melhorar a sensibilidade hepática à ação da insulina dado pelo aumento na fosforilação e ativação do IRS1 e AKT. Além disso, os autores observaram a supressão da HGP e redução da expressão da G6Pase e PEPCCK, duas enzimas fundamentais para a gliconeogênese no fígado. Porém o efeito da leptina hipotalâmica sobre a expressão gênica destas enzimas foi bloqueado em animais submetidos à cirurgia de vagotomia. Dessa maneira estes resultados sugerem que existe

um circuito neuronal que interliga a sinalização da leptina no hipotálamo à inervação autonômica hepática e que este tem uma função fisiológica crucial no controle da sensibilidade à insulina.

Nos últimos anos surgiram alguns estudos mostrando que a ação central da leptina pode modular o metabolismo da glicose também por aumentar a captação deste carboidrato por tecidos periféricos, em especial pelo músculo estriado esquelético. No final da década de 1990 Kamohara e colaboradores (1997) publicaram um trabalho mostrando que a administração de leptina, tanto intraperitoneal (IP) quanto intracerebroventricular (ICV), foi capaz de estimular a captação de glicose em tecido adiposo marrom (BAT) e músculo esquelético (EDL e *soleus*). Entretanto, o efeito foi maior quando administrada via ICV, sendo que a denervação bloqueou este efeito. Ainda neste estudo os autores se preocuparam em mostrar que o efeito ICV da leptina sobre a captação periférica da glicose não foi fruto de uma alteração da insulinemia sérica. Dois anos depois Minokoshi e colaboradores (1999) endossaram os resultados de Kamohara e seus colaboradores. Eles mostraram que o núcleo ventromedial (VMH) era um dos principais sítios de ação da leptina para que ocorresse um aumento na captação de glicose pelo BAT, coração e músculo estriado esquelético (EDL, gastrocnemius, *soleus*), em especial pelo *soleus*. Além disso, estes pesquisadores mostraram que tal efeito não se devia a ação periférica da leptina, uma vez que a administração intraperitoneal desse hormônio – na mesma concentração que a administrada centralmente – não foi capaz de gerar tal fenômeno. Mais uma vez estes autores demonstraram que a denervação bloqueou este efeito.

Poucos anos depois Minokoshi e colaboradores (2002) mostraram que a administração de leptina era capaz de estimular a ativação da enzima AMPK, em músculo estriado esquelético, possivelmente por duas vias: i) Uma pela ação direta da leptina sobre o músculo; ii) pelo envolvimento do hipotálamo e da via α -adrenérgica. Nesse estudo eles comprovaram que a

incubação direta de músculo soleus *ex vivo* com leptina (10 nM, por 30 min) foi capaz de aumentar em cerca de três vezes a ativação da AMPK. Além disso, eles verificaram que a administração de fentolamina, um antagonista α -adrenérgico, bem como a denervação cirúrgica, inibiram a ativação tardia da AMPK, 6h após a administração da leptina de maneira intravenosa (IV) ou intrahipotalâmica (IHP). A partir destes estudos eles concluíram que o efeito tardio da ação indireta da leptina sobre a ativação da AMPK em músculo esquelético ocorre através de neurônios hipotalâmicos que estimulam a via simpática α -adrenérgica. Porém os efeitos imediatos da leptina parecem ser independentes dos nervos simpáticos e motores, uma vez que este hormônio pode agir diretamente sobre o músculo esquelético e induzir a ativação desta enzima possivelmente pelo aumento transitório nas concentrações de AMP.

Corroborando os estudos anteriores Toda e colaboradores (2009) publicaram um trabalho mostrando que a injeção de leptina no VMH de camundongos aumentou a captação de glicose em músculo esquelético (EDL e porção vermelha do gastrocnemius) 6 horas após o tratamento. O mesmo efeito foi observado em coração e BAT, porém em tempos diferentes – de 3h à 6h após o tratamento. Além disso, a leptina agindo nesta região do hipotálamo aumentou a expressão de GLUT4 e UCP1 em BAT, efeito que não foi observado em músculo esquelético e coração. Adicionalmente estes autores comprovaram que a administração de leptina no ARC hipotalâmico foi capaz de estimular a captação de glicose somente em BAT e apenas após 6 horas de tratamento. Tais resultados sugerem que o VMH é uma região chave para a ação da leptina na regulação da captação de glicose em músculo esquelético, coração e BAT, enquanto que a ação desse hormônio no ARC parece ser responsável pelo estímulo da captação de glicose apenas em BAT. Estes autores verificaram ainda que a infusão de leptina no hipotálamo dorsomedial (DMH) e paraventricular (PVH) não resultou em efeito sobre a captação de glicose nos tecidos periféricos

analisados. Sendo assim eles concluíram que os núcleos hipotalâmicos VMH e ARC são os principais responsáveis por regular a captação de glicose em diferentes tecidos periféricos, sob o estímulo da leptina.

Em continuação aos estudos descritos no parágrafo anterior os autores constataram que a aplicação de MTII, agonista dos receptores de melanocortina (MC3R e MC4R), no VMH estimulou a captação de glicose em músculo esquelético, coração e BAT, porém preferencialmente em BAT. Sabe-se atualmente que os neurônios POMC do ARC recebem sinais excitatórios da região dorsomedial do VMH (Sternson et al., 2005) e que a restauração da expressão de ObRb nesta região em ratos Koletsky aumentou a expressão de mRNA de POMC em ARC (Keen-Rhinehart et al., 2005), dessa maneira os autores propõem que a estimulação por leptina dos neurônios do VMH resulta na ativação de um conjunto de neurônios POMC no ARC e conseqüentemente um aumento na captação de glicose em músculo esquelético, coração e BAT (Toda et al., 2009).

Alguns pesquisadores mostraram que a insulina e a leptina ativam vias em comum no SNC (Spanswick et al., 1997; Niswender et al., 2001/2003; Xu et al., 2005) e que animais que apresentam a deleção do gene para IRS2 em neurônios hipotalâmicos são resistentes à insulina, intolerantes à glicose, obesos e diabéticos (Kubota et al., 2004; Lin et al., 2004). Adicionalmente Bates e colaboradores (2005) observaram que a regulação do metabolismo da glicose pela leptina – diferente do controle da ingestão alimentar e peso corpóreo – envolve um mecanismo independente da sinalização da STAT3. Muitas evidências sugerem então um modelo no qual a transdução do sinal no hipotálamo pela via IRS/PI3K desempenha importante função na sensibilidade periférica à insulina. Faz pelo menos uma década desde a descoberta de que a ação central da leptina controla a homeostase da glicose na periferia, contudo pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos neste fenômeno. Dessa maneira o objetivo desse trabalho foi investigar os mecanismos

moleculares pelos quais a ação hipotalâmica da leptina aumenta a captação da glicose e melhora sua homeostase em músculo esquelético, uma vez que este tecido é fundamental para a homeostase glicêmica em mamíferos.

Objetivo Geral

Investigar os mecanismos moleculares pelos quais a ação hipotalâmica da leptina aumenta a captação da glicose e melhora sua homeostase em músculo esquelético.

Objetivos Específicos

Avaliar:

- Os efeitos da ação central da leptina sobre a fosforilação das proteínas JAK2 e AKT no hipotálamo e sobre a homeostase da glicose (concentração sérica de glicose e insulina).
- A modulação da fosforilação da JAK2 e AKT em músculo esquelético pela ação hipotalâmica da leptina.
- A participação da proteína PI3K hipotalâmica e da via adrenérgica na modulação da fosforilação da AKT em músculo esquelético e na tolerância à glicose após estímulo central com leptina.
- O efeito central da leptina sobre a fosforilação da JAK2, AMPK, ACC e a expressão do PGC1 α em músculo esquelético.

2 – CAPÍTULO

Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 α activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism.

Erika A F R Roman ^{a,1}, Daniel Reis ^{b,1}, Talita Romanatto ^c, Denis Maimoni ^b, Eduardo A Ferreira ^b, Gustavo A Santos ^b, Adriana S Torsoni ^b, Licio A Velloso ^c, Marcio A Torsoni ^{b *}

^a Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^b Universidade Braz Cubas, CEP 08.773-380, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

^c Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

¹E.A.F.R. Roman and D.Reis contributed equally for this study.

* Corresponding author: Marcio A. Torsoni

Universidade Braz Cubas-Área da Saúde-Campus I

Av. Francisco Rodrigues Filho, 1233,

Mogilar, Mogi das Cruzes-São Paulo, Brazil.

CEP 08773-380

Phone: +55 (19) 35218592

Fax: +55 (19) 37888950

E-mail: torsoni@yahoo.com

Keywords: Glucose homeostasis; skeletal muscle; hypothalamus; leptin; insulin PI3K; AKT; AMPK.

Abstract

Central leptin action requires PI3K activity to modulate glucose homeostasis and peripheral metabolism. However, the mechanism behind this phenomenon is not clearly understood. We hypothesize that hypothalamic PI3K activity is important for the modulation of the AMP-activated protein kinase (AMPK)/acetyl-CoA carboxylase (ACC) pathway, PGC1 α , and AKT in skeletal muscle (SM). To address this issue, we injected leptin into the lateral ventricle of rats. Hypothalamic JAK2 and AKT were activated by intracerebroventricular (ICV) injection of leptin in a time-dependent manner. Central leptin improved tolerance to glucose (GTT), increased PGC1 α expression, and AKT, AMPK, ACC and JAK2 phosphorylation in the soleus muscle. Previous ICV administration of either LY294002 or propranolol (IP) blocked these effects. We concluded that the activation of the hypothalamic PI3K pathway is important for leptin-induced AKT phosphorylation, as well as for active catabolic pathway through AMPK and PGC1 α in SM. Thus, a defective leptin signalling PI3K pathway in the hypothalamus may contribute to peripheral resistance to insulin associated to diet-induced obesity.

1. Introduction

Leptin and insulin are major hypothalamus signals that regulate energy homeostasis and body adiposity (Kamohara, et al. 1997; Obici, et al. 2002; Woods, et al. 1998). They share common intracellular signal transduction pathways (Carvalheira, et al. 2005; Niswender and Schwartz 2003). It is noteworthy that both central leptin and insulin resistance can lead to hyperphagia, increased plasma insulin and leptin concentrations, and changes in energy balance and fat mass (Kahn and Flier 2000; Porte, et al. 2002).

Leptin is an adipocyte hormone that acts to decrease food intake and increase energy expenditure (Campfield, et al. 1995; Pelleymounter, et al. 1995; Zhang, et al. 1994). The activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) has been shown to play a critical role in the leptin hypothalamic intracellular signalling pathways (Niswender, et al. 2001; Vaisse, et al. 1996). In this context, leptin seems to control adipose tissue lipogenesis by STAT3-independent mechanisms in the hypothalamus, but this effect is blocked when hypothalamic PI3K is inhibited or upon sympathetic

denervation of adipose tissue (Buettner, et al. 2008). On the other hand, to inhibit food intake, leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Gao, et al. 2007), an important enzyme responsible for the biosynthesis of malonyl-CoA. The activity of ACC is regulated by reversible phosphorylation, and AMP-activated protein kinase (AMPK) directly phosphorylates and inactivates this downstream target (Winder and Hardie 1996).

Furthermore, the inhibition of hypothalamic AMPK is necessary for the effects of leptin on food intake and body weight, as constitutively active AMPK blocks these effects (Minokoshi, et al. 2004). On the other hand, leptin directly stimulates fatty-acid oxidation and reduces fatty-acid esterification in muscle in vitro by activating AMPK (Minokoshi, et al. 2002; Morton, et al. 2006; Schwartz, et al. 2000). This double effect allows leptin to control energy expenditure and food intake by acting on skeletal muscles and the hypothalamus.

The hypothalamic action of leptin is also capable of promoting a significant increase in the glucose uptake without changes in insulin level in heart, skeletal muscle, and brown adipose tissues, but not in white adipose tissue (Kamohara et al. 1997; Minokoshi, et al. 1999). Koch and colleagues showed that the central action of insulin can regulate peripheral glucose and fat metabolism in mice (Koch, et al. 2008). The effects of central leptin appear to be mediated through the tissue sympathetic innervation (Haque, et al. 1999). Recently, a study performed with chemical sympathectomy revealed an important role of the sympathetic nervous system in stimulating energy expenditure by increasing the resting metabolic rate (Dobbins, et al. 2003).

Both leptin and insulin activate similar pathways in hypothalamic neurons and several findings have related hypothalamic PI3K to these pathways. Hypothalamic IRS2 plays an important role in glucose homeostasis (Kubota, et al. 2004) and the glucose metabolism involves a STAT3 activation-independent mechanism (Bates, et al. 2005). However, the complete signalling cascade underlying the controls of glucose homeostasis by leptin is yet unknown. Here we investigated the role of hypothalamic PI3K in the central effects of leptin on PGC1 α expression and AKT and AMPK phosphorylation in skeletal muscle.

2. Material and Methods

2.1. *Experimental animals and surgical procedures*

Male Wistar rats (8 wk old, 250–280 g) from the University of Campinas animal breeding centre were used in all experiments. The rats were maintained at room temperature (25 °C) and in 12:12-h light-dark cycles with free access to water and chow, unless indicated otherwise. The rats were chronically instrumented with an ICV cannula and kept under controlled temperature and light-dark conditions (07:00–19:00 h) in individual metabolic cages. Seven days after the ICV cannula installation, the rats were tested for cannula function and position and thereafter randomly assigned to one of the experimental groups. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation were followed throughout the study. Briefly, the animals were anesthetized with 50 mg/kg ketamine and 5 mg/kg diazepam (IP) and positioned onto a Stoelting stereotaxic apparatus after the loss of cornea and foot reflexes. A stainless steel 23 gauge guide cannula with indwelling 30 gauge obturator was stereotaxically implanted into the lateral cerebral ventricle at pre-established coordinates, anteroposterior, 0.2 mm from bregma, lateral, 1.5 mm; and vertical, 4.2 mm, according to a previously reported technique (Michelotto, et al. 2002). Cannulas were considered patent and correctly positioned by dipsogenic response elicited after injection of angiotensin II (2 µL of solution 10^{-5} M-20 pmoles) (McKinley, et al. 2001). All procedures were approved by the Ethical Committee for Ethics in Animal Research (University of Campinas).

2.2. *Protocols for leptin, LY, propranolol and insulin treatments*

Leptin and LY 294002 (PI3K inhibitor) were administered through ICV injection in all the experiments. Propranolol (10mg/kg of body weight) was administered into the peritoneal cavity 30 min before leptin injection (3 pmoles, ICV) (Haque et al. 1999; Minokoshi et al. 1999; Ropelle, et al. 2008). When necessary, the treatment with leptin was administered 30 min before the insulin (6 pmoles) injection through the cava vein in fasted rats (food was withdrawn 12 h before the treatment). Ly 294002 was injected (3 pmoles, ICV) 60 min before the leptin treatment. Leptin, Ly 294002, propranolol and saline solution were buffered with 153 mM NaCl and 10^{-1} M sodium phosphate buffer, pH 7.4.

2.3. Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

The intraperitoneal glucose tolerance test was performed after overnight fasting. The rats were anesthetized as described above. After collection of an unchallenged sample (time 0), 20% glucose (2.0 g/Kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Tail blood samples were collected at different intervals for the determination of glucose concentration.

2.4. Tissue extraction and immunoblotting

The rats were anesthetized with 50 mg/kg ketamine and 5 mg/kg diazepam (ip) before soleus muscle excision. Next, a 3-mm coronal section from the hypothalamus was sliced out and both the hypothalamus and muscle tissues were snap frozen in liquid nitrogen. From the 3-mm frozen coronal slice from the hypothalamic region, a ± 2 mm X 2-mm square from the hypothalamus including all the arcuate, ventromedial, and periventricular nuclei was then dissected out (Perrin, et al. 2004). The fragments were immediately 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). The insoluble material was removed by centrifugation (10,000 g) for 25 min at 4 °C. The supernatant protein concentration was determined by the Bradford dye-binding method. The supernatant was resuspended in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min before separation in SDS PAGE using a miniature slab gel apparatus (Bio Rad, Richmond, CA). The gels (8%) were loaded with 100 μ g of the total protein. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant). The nitrocellulose transfers were probed with specific antibodies. The phospho-AKT (p-AKT), phospho-JAK2 (p-JAK2), PGC1 α and GAPDH antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA. The phospho-AMPK (p-AMPK) and phospho-ACC (p-ACC) antibodies were obtained from Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA. Subsequently, the blots were incubated with HRP-conjugate antibodies (KPL, Gaithersburg, MD- USA). The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software,

ScionCorp) and the intensities of the p-AKT, p-JAK2, p-AMPK, p-ACC, and PGC1 α bands were normalized to those of total protein to correct for protein loading in the case of cellular lysate extracts.

2.5. Biochemical and hormonal measurements

Serum glucose was determined by the glucose oxidase method and plasma insulin was determined using a commercially available kit following the manufacturer's (DSL inc.) directions. All determination blood samples were collected from the tail vein of fasted rats.

2.6. Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as means $\pm$ SE of the indicated number of experiments. Blot results are presented as direct band comparisons in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (ScionCorp). Student's t-tests of unpaired samples and variance analysis (ANOVA) for multiple comparisons were used as appropriate. Post hoc test (Tukey) was employed when required. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of central leptin on hypothalamic JAK2 and AKT

Initially we examined whether ICV leptin treatment actually induced hypothalamic JAK2 and AKT phosphorylation. Maximum JAK2 phosphorylation (Fig. 1A) was achieved at 15 min after ICV leptin administration. At 15 and 30 min after ICV leptin hypothalamic AKT phosphorylation increased ($p \leq 0.05$) compared to control (Fig.1B). The AKT phosphorylation at the subsequent time points (60 and 120 min) was similar to that achieved at 30 min. The previous hypothalamic administration of LY294002, a PI3K inhibitor, reduced ($p \leq 0.05$) the hypothalamic AKT phosphorylation stimulated by ICV-administered leptin when compared to the effect of the leptin group (Fig.1C). Additionally, the previous ICV injection of the JAK2 inhibitor reduced ($p \leq 0.05$) the AKT phosphorylation induced by ICV leptin (Fig. 1D). As expected, the expression of AKT was not modified by the treatment. Thus, the phosphorylation of AKT was normalized against total AKT.

3.2. Effects of central leptin on glucose homeostasis

The evaluation of glucose clearance during the glucose tolerance test (GTT) showed that leptin (2 nmol, ICV) administration to fasted rats 30 min before beginning GTT promoted the reduction of the area under the curve (50 % in relation to the control). When leptin was administered 360 min before the start of GTT, the effect of leptin was reduced ($p \leq 0.05$) when compared to its administration 30 min before (15 % in relation to the control) (Fig. 2A). The effect of ICV leptin on the GTT was completely excluded when LY 294002 was administered 1 h before leptin. A similar result was obtained for the previous IP administration of propranolol (10 mg/kg), a non-selective β -antagonist (Fig. 2B). While the area under the curve (AUC) of GTT for the leptin group was 10.050 (arbitrary unit), the LY and propranolol groups showed AUC values of 13.337 and 12.637, respectively, which were very similar to that of the control group (AUC: 13.035) (insert Fig.2B).

3.3. Modulation of JAK2 and AKT phosphorylation in skeletal muscle by central leptin

The main protein related to glucose uptake in skeletal muscle is AKT. As expected, concomitant to the improvement in the GTT, ICV leptin administration also increased ($p \leq 0.05$) the AKT phosphorylation stimulated by insulin in skeletal muscle in a time-dependent manner. However, leptin did not promote the phosphorylation of AKT in skeletal muscle (Fig. 3A) by itself. JAK2 phosphorylation in the skeletal muscle also increased in a time-dependent manner. After 15 min and 30 min, JAK2 phosphorylation was higher ($p \leq 0.05$) in the leptin-treated rats than in the control group (Fig.3B).

3.4. Effects of the PI3K (LY294002) inhibitor and the β -adrenergic antagonist, propranolol on AKT phosphorylation in skeletal muscle

To evaluate whether the leptin effect (ICV) was promoted by skeletal muscle sympathetic outflow, we administered propranolol (10 mg/kg body weight), a β -adrenergic antagonist, via IP 30 min before ICV leptin. Propranolol reduced ($p \leq 0.05$) the ICV leptin-stimulated phosphorylation of AKT (Fig.4). In another set of experiments, the hypothalamic PI3K pathway was blocked by the administration of LY 294002 (ICV). This procedure was performed in ICV-cannulated rats 60 min before ICV leptin injection. In this model, the

administration of LY294002 reduced ($p \leq 0.05$) the effect of leptin (ICV) on the insulin-induced serine phosphorylation of AKT in skeletal muscle. The previous administration of either propranolol (IP) or LY294002 (ICV) did not alter the insulin-induced serine phosphorylation of AKT in skeletal muscle (Fig.4).

3.5. Central leptin modulates the phosphorylation of JAK2, AMPK, ACC, and the expression of PGC1 α in skeletal muscle

The central action of leptin exerted an important effect on AMPK/ACC phosphorylation in skeletal muscle. AMPK and ACC phosphorylation were higher ($p \leq 0.05$) in leptin-treated animals than in the control group. These effects were blocked by previous (60 min before ICV leptin) ICV administration of LY294002, a PI3K inhibitor (Fig.5). This model also evaluated the proteins that could ensure glucose utilization in skeletal muscle. Thus, we evaluated JAK2 phosphorylation and PGC1 α expression after leptin injection. As can be observed in Fig. 5, the expression of PGC1 α increased (100%) when compared to the control result ($p \leq 0.05$), and this effect was blocked by previous (60 min before ICV leptin) ICV administration of LY294002. The p-JAK2 level in skeletal muscle after ICV leptin increased 3.5-fold when compared to the control ($p \leq 0.05$). LY294002 (Fig.5A), as well as propranolol (Fig. 5C), reduced JAK2 phosphorylation to control-like values. The inhibitors alone exerted no effect on the JAK2 phosphorylation (Fig. 5B and 5C).

3.6. Serum glucose and insulin levels

To discard the possibility of leptin-induced insulin secretion, we next evaluated serum glucose and insulin levels. As shown in Table 1, both serum insulin and glucose levels were similar in the ICV saline- and leptin-treated groups.

4. Discussion

The hypothalamus is a specialized brain area that evolved for energy homeostasis (Kamohara et al. 1997; Obici et al. 2002; Woods et al. 1998). Insulin and leptin are major peripheral signals that control food intake and peripheral metabolism (Plum, et al. 2006; Woods et al. 1998). There is growing evidence that leptin also plays an important role in the regulation of glucose homeostasis and insulin action (Liu, et al. 1998; Rossetti,

et al. 1997). Furthermore, the investigation of the direct action of leptin in peripheral tissues and the effect after its central action in the hypothalamus has produced a large amount of information about the central control of peripheral metabolism. In the hypothalamus Buttner and colleagues (Buettner, et al. 2000) showed that moderate hyperleptinemia promotes the correction of skeletal muscle insulin resistance. More recently, Pocai and colleagues showed that leptin ICV infusion acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance (Pocai, et al. 2005). They also showed that the effects of central leptin on food intake and hepatic glucose metabolism require hypothalamic STAT3 activation (Buettner, et al. 2006). However, leptin controls the adipose tissue lipogenesis via mechanisms independent of the central activation of STAT3 (Buettner et al. 2008). In the liver, acute ICV leptin infusion antagonizes the action of insulin on PEPCK gene expression. This biochemical action occurs in response to minimal amounts of central leptin and is part of the lipostatic action of leptin (Liu et al. 1998). Thus, the central action of leptin results in metabolic changes in different tissues and by different molecular mechanisms.

In our study, central leptin infusion resulted in a marked improvement of glucose tolerance test in rats, as had been previously demonstrated (Haque et al. 1999; Minokoshi et al. 1999). The central infusion of leptin also increased insulin-stimulated AKT phosphorylation in skeletal muscle, an important molecular mechanism to glucose uptake stimulated by insulin. Muscle cell glucose uptake is regulated mainly by transmembrane transporter GLUT4, which is redirected from its sequestered cytoplasmic location to the cell membrane in response to AKT-mediated insulin signalling and contractile-induced activation of AMPK, thereby stimulating glucose entry (Bryant, et al. 2002). The first possible explanation for improved skeletal muscle AKT activation would be increased insulin secretion in response to leptin injection (ICV). This hypothesis was discarded because central leptin does not affect insulin secretion. According to the literature, central leptin increases glucose infusion rates during euglycemic hyperinsulinemic clamp and does not affect glucose-stimulated insulin secretion (Park, et al. 2008).

Previous intraperitoneal treatment with propranolol, a β -adrenergic antagonist, blocked the effect of leptin on the GTT and AKT phosphorylation in skeletal muscle. These results corroborate previous studies that demonstrated a reduction in glucose uptake by propranolol in the soleus muscle (Haque et al. 1999). Although

the metabolic effects observed in the skeletal muscle after central action of leptin appears to be mediated through α adrenergic receptors (Hutchinson and Bengtsson 2006; Kishi, et al. 2000; Minokoshi et al. 2002), the metabolic effects of β adrenergic receptor in skeletal muscle is known. In fact, the studies performed with *extensor digitorum longus* (EDL) muscle and *gastrocnemius* muscle showed that the AMPK activation and the increased in the AMP:ATP ratio after incubation with interleukin 6 were blocked by co-incubation with propranolol (Kelly, et al. 2009). In addition, Lane and colleagues had previously indicated that a β blocker (propranolol) was capable of preventing the increased expression of UCP3 in skeletal muscle induced by centrally administered C75, a potent inhibitor of fatty acid synthase (Cha, et al. 2005). Like C75, leptin increases malonyl-CoA concentration in the hypothalamus (Wolfgang, et al. 2007) and peripheral energy utilization (Kumar, et al. 2002), indicating that the synthesis of malonyl-CoA could be an important hypothalamic signal to the activation of adrenergic pathway (Cha, et al. 2006).

It is well known that skeletal muscles are composed of slow-twitch and fast-twitch fibers that are different in the β -adrenergic receptor distributions. In skeletal muscle β 2-adrenergic subtype represent about 80% – 95% of total β -adrenergic receptors and relatively higher in the slow-twitch fiber-rich soleus muscle than in the fast-twitch fiber-rich EDL muscle (Jensen, et al. 2002; Jensen, et al. 1995). Therefore, we believe that β -adrenergic receptor, probably β 2-adrenergic subtype, might be an additional mechanism of control of the metabolic pathway to glucose uptake in the soleus muscle.

Nevzorova et al. (2002) suggested that the glucose uptake stimulated by the β -adrenergic agonist in cell line L6 in skeletal muscle requires PI3K activation (Nevzorova et al. 2002). Later, Yamamoto et al. (2007) demonstrated that in these cells the adrenergic stimulation through β 2-adrenoceptors activates a PI3K pathway that stimulates glycogen synthesis. The functional link between G protein-coupled receptors and PI3K/AKT pathway in the skeletal muscle may occur through JAK2 protein, as demonstrated by Liu and colleagues using human embryonic kidney 293 cells (Liu, et al. 2006). This study showed that the stimulation of Galpha(s) by cholera toxin or β 2-adrenergic receptors and the activation of adenylyl cyclase by forskolin or dibutyryl-cAMP promoted STAT3 phosphorylation. This model suggests that STAT3 phosphorylation may be

mediated by protein kinase A, ERK, JNK, and c-Src/JAK2 activation. Recently, Westphal and colleagues also proposed a novel regulatory link between β 3-adrenergic and JAK/STAT signalling (Westphal, et al. 2008) in adipocytes that requires the activation of protein kinase A. In our study, leptin (ICV) induced JAK2 phosphorylation in skeletal muscle after hypothalamic leptin administration. This effect was inhibited by both the previous injection (ICV) of PI3K inhibitor (LY294002) and propranolol (IP). These findings open the possibility of hypothalamic cross-talking between JAK2 and the IRS/PI3K protein as being responsible for AKT activation in skeletal muscle. Furthermore, the JAK2 and AKT activation in skeletal muscles appears to depend on the hypothalamic PI3K pathway and β -adrenergic receptor activation.

Hypothalamic action of leptin activates AMPK-catalyzed phosphorylation of ACC and fatty acid oxidation in skeletal muscle (Minokoshi et al. 2002). It is known that skeletal muscle is the most abundant fatty acid metabolizing tissue and the AMPK has an important role as a regulator of fatty acid metabolism in this tissue. The central administration of leptin increased both AMPK and ACC phosphorylation and PGC1 α expression in the skeletal muscle. These findings indicate that the central action of leptin may improve glucose homeostasis through AMPK and PGC1 α activation dependent on the hypothalamic PI3K pathway, as it will be discussed below. PGC-1 α not only facilitates glucose entry, but it also ensures effective glucose utilization by increasing gene expression related to oxidative phosphorylation (Mootha, et al. 2004). In addition, studies in transgenic mice suggest that robust levels of PGC-1 α may induce muscle fibre-type switching from fast-twitch (type II) to slow-twitch (type I) muscle fibres (Lin, et al. 2002). The AMPK activation potentially stimulates fatty acid oxidation in muscle by inhibiting the activity of ACC and preventing the accumulation of lipid nonadipose tissues (Minokoshi et al. 2002; Winder and Hardie 1996). AMPK activation may also contribute to glucose entry through an insulin-independent mechanism (Bryant et al. 2002) and appears to be related to increased PGC1 α expression (Irrcher, et al. 2009), mitochondrial biogenesis, and increased glucose and fatty acid oxidation capacity in skeletal muscle (Gibala, et al. 2008). These effects have an important impact on whole-body energy expenditure, however the proteins involved in the hypothalamic signal started by leptin are not completely elucidated.

Recently, attention has been focused on the potential role of the PI3K pathway in inducing rapid leptin effects in hypothalamic neurons (Bookout and Mangelsdorf 2003; Xu, et al. 2005). To try to identify these proteins, two important proteins to leptin signalling in the hypothalamus, JAK2 (AG490) and PI3K (LY294002), were first inhibited. The results showed that the hypothalamic AKT activation by leptin was not achieved after the hypothalamic inhibition of PI3K or JAK2. Moreover, the previous administration (ICV) of LY294002 prevented the AMPK/ACC phosphorylation and PGC1 α expression induced by central leptin. The improvement in the glucose tolerance test and AKT phosphorylation in skeletal muscle induced by ICV leptin was also blocked by both hypothalamic PI3K inhibition and β -adrenergic antagonist. These data demonstrate that hypothalamic PI3K/AKT appear to play an important role in the transduction of leptin-induced changes in skeletal muscle sympathetic outflow, as it occurs for renal sympathetic nerve activity (Rahmouni, et al. 2003). Similarly, Morton and colleagues improved insulin sensitivity after ARC-directed microinjection of a constitutively active AKT mutant in Koletsy rats that had developed obesity and insulin resistance (Morton, et al. 2005), showing that hypothalamic PI3K/AKT is an important pathway to control energy homeostasis.

The present study investigated the modulation of insulin signalling in skeletal muscle after central administration of leptin. Insulin signalling in skeletal muscle is obviously important for glucose homeostasis. We have shown that central leptin stimulates AKT, JAK2, AMPK, and ACC phosphorylation in skeletal muscle and improves the tolerance to glucose. Additionally, the central administration of leptin increased PGC1 α expression in skeletal muscle. PGC-1 α has emerged as a master regulator of mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation in skeletal muscle (Jager, et al. 2007; Rohas, et al. 2007), along with AMPK. Our results also showed that the hypothalamic activation of JAK2 and PI3K is important for these effects and suggests that central leptin modulates the catabolic pathway in skeletal muscle by a hypothalamic PI3K-dependent mechanism.

Thus, central resistance to leptin may contribute to reduced AMPK and PGC1 α activation in skeletal muscle, leading to low fuel oxidation and contributing to the development of the insulin metabolic resistance phenotype and type 2 diabetes mellitus. Currently, there is a great interest in PGC-1 α because of rapidly

growing evidence that it is a powerful regulator of energy metabolism under both health and disease conditions (Finck and Kelly 2006; Liang and Ward 2006).

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that may be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP and CNPq. We thank Mr. Laerte J. Silva for the English language editing and Gerson Ferraz and Márcio Cruz for the technical support.

References

- Bates SH, Kulkarni RN, Seifert M & Myers MG, Jr. 2005 Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab* **1** 169-178.
- Bookout AL & Mangelsdorf DJ 2003 Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* **1** e012.
- Bryant NJ, Govers R & James DE 2002 Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3** 267-277.
- Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, Su K, Cheng B, Li X, Harvey-White J, et al. 2008 Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med* **14** 667-675.
- Buettner C, Poci A, Muse ED, Etgen AM, Myers MG, Jr. & Rossetti L 2006 Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* **4** 49-60.
- Buettner R, Newgard CB, Rhodes CJ & O'Doherty RM 2000 Correction of diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, and skeletal muscle insulin resistance by moderate hyperleptinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278** E563-569.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R & Burn P 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269** 546-549.
- 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** 48-57.
- Cha SH, Hu Z, Chohnan S & Lane MD 2005 Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** 14557-14562.

- Cha SH, Rodgers JT, Puigserver P, Chohnan S & Lane MD 2006 Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 15410-15415.
- Dobbins RL, Szczepaniak LS, Zhang W & McGarry JD 2003 Chemical sympathectomy alters regulation of body weight during prolonged ICV leptin infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** E778-787.
- Finck BN & Kelly DP 2006 PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* **116** 615-622.
- Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohnan S, Smith WW, Tamashiro KL, et al. 2007 Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 17358-17363.
- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ & Hargreaves M 2008 Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **106** 929-934.
- Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M & Shimazu T 1999 Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* **48** 1706-1712.
- Hutchinson DS & Bengtsson T 2006 AMP-activated protein kinase activation by adrenoceptors in L6 skeletal muscle cells: mediation by α 1-adrenoceptors causing glucose uptake. *Diabetes* **55** 682-690.
- Irrcher I, Ljubcic V & Hood DA 2009 Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296** C116-123.
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J & Spiegelman BM 2007 AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 12017-12022.
- Jensen J, Brennesvik EO, Bergersen H, Oseland H, Jebens E & Brors O 2002 Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles. *Pflugers Arch* **444** 213-219.
- Jensen J, Brors O & Dahl HA 1995 Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types. *Pharmacol Toxicol* **76** 380-385.
- Kahn BB & Flier JS 2000 Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **106** 473-481.
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM & Charron MJ 1997 Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389** 374-377.
- Kelly M, Gauthier MS, Saha AK & Ruderman NB 2009 Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by Interleukin-6 in rat skeletal muscle: Association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes*.
- Kishi K, Yuasa T, Minami A, Yamada M, Hagi A, Hayashi H, Kemp BE, Witters LA & Ebina Y 2000 AMP-Activated protein kinase is activated by the stimulations of G(q)-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **276** 16-22.
- Koch L, Wunderlich FT, Seibler J, Konner AC, Hampel B, Irlenbusch S, Brabant G, Kahn CR, Schwenk F & Bruning JC 2008 Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *J Clin Invest* **118** 2132-2147.

- Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K, Takamoto I, Satoh H, Maki T, Kubota T, et al. 2004 Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest* **114** 917-927.
- Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR & Lane MD 2002 Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** 1921-1925.
- Liang H & Ward WF 2006 PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30** 145-151.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, et al. 2002 Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418** 797-801.
- Liu AM, Lo RK, Wong CS, Morris C, Wise H & Wong YH 2006 Activation of STAT3 by G alpha(s) distinctively requires protein kinase A, JNK, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **281** 35812-35825.
- Liu L, Karkanas GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J & Rossetti L 1998 Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem* **273** 31160-31167.
- McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D & Mendelsohn FA 2001 Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28** 990-992.
- Michelotto JB, Carnevali JB, Saad MJ & Gontijo JA 2002 Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull* **57** 613-618.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foulfelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, et al. 2004 AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428** 569-574.
- Minokoshi Y, Haque MS & Shimazu T 1999 Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* **48** 287-291.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D & Kahn BB 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415** 339-343.
- Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, et al. 2004 Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** 6570-6575.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS & Schwartz MW 2006 Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443** 289-295.
- Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ & Schwartz MW 2005 Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab* **2** 411-420.
- Nevzorova J, Bengtsson T, Evans BA & Summers RJ 2002 Characterization of the beta-adrenoceptor subtype involved in mediation of glucose transport in L6 cells. *Br J Pharmacol* **137** 9-18.
- Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr. & Schwartz MW 2001 Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* **413** 794-795.
- Niswender KD & Schwartz MW 2003 Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* **24** 1-10.

- Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG & Rossetti L 2002 Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* **5** 566-572.
- Park S, Hong SM, Sung SR & Jung HK 2008 Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* **149** 445-454.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T & Collins F 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269** 540-543.
- Perrin C, Knauf C & Burcelin R 2004 Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* **145** 4025-4033.
- Plum L, Belgardt BF & Bruning JC 2006 Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* **116** 1761-1766.
- Pocai A, Morgan K, Buettner C, Gutierrez-Juarez R, Obici S & Rossetti L 2005 Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* **54** 3182-3189.
- Porte D, Jr., Baskin DG & Schwartz MW 2002 Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* **60** S20-29; discussion S68-84, 85-27.
- Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA & Mark AL 2003 Intracellular mechanisms involved in leptin regulation of sympathetic outflow. *Hypertension* **41** 763-767.
- Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C & Spiegelman BM 2007 A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 7933-7938.
- Ropelle ER, Fernandes MF, Flores MB, Ueno M, Rocco S, Marin R, Cintra DE, Velloso LA, Franchini KG, Saad MJ, et al. 2008 Central exercise action increases the AMPK and mTOR response to leptin. *PLoS ONE* **3** e3856.
- Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, Hawkins M, Wu J & Wang J 1997 Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem* **272** 27758-27763.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ & Baskin DG 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* **404** 661-671.
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M & Friedman JM 1996 Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* **14** 95-97.
- Westphal S, Perwitz N, Iwen KA, Kraus D, Schick R, Fasshauer M & Klein J 2008 Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by beta-adrenergic stimulation of JAK/STAT. *Horm Metab Res* **40** 165-171.
- Winder WW & Hardie DG 1996 Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* **270** E299-304.
- Wolfgang MJ, Cha SH, Sidhaye A, Chohnan S, Cline G, Shulman GI & Lane MD 2007 Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** 19285-19290.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr. & Schwartz MW 1998 Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280** 1378-1383.

Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW & Barsh GS 2005 PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* **115** 951-958.

Yamamoto DL, Hutchinson DS & Bengtsson T 2007 Beta(2)-Adrenergic activation increases glycogen synthesis in L6 skeletal muscle cells through a signalling pathway independent of cyclic AMP. *Diabetologia* **50** 158-167.

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

Figure legends

Table 1. Glucose and insulin levels in serum from control animals (basal) and animals treated with ICV leptin.

Values are means $\pm$ SE from five animals. There were no significant differences in glucose and insulin levels for any of the times tested.

Fig. 1. Hypothalamic JAK2 (A) and AKT (B) phosphorylation in control and leptin-treated rats. Fasted rats were sacrificed before (control), 5, 15, 30, 60 and 120 min after leptin injection (3 pmoles, ICV). Hypothalamic AKT phosphorylation in control, leptin-treated rats, and in leptin-treated rats previously treated with LY294002 (3 pmol, ICV) (C), and leptin-treated rats previously treated with AG490 (10 pmol, ICV) (D). Bars show quantification of p-JAK2 normalized by total GAPDH and p-AKT normalized by total AKT in tissue. Data are means $\pm$ SE, n = 5. $p \leq 0.05$ to (A) * leptin 5 vs. saline; **leptin 15 vs. leptin 5 and saline; #leptin 30 vs. saline; (B) **leptin 15 vs. leptin 5 and saline; #leptin 30 vs. saline, leptin 5 and leptin 15; ###leptin 30, 60 and 120 vs. saline; (C and D) *Leptin vs. saline and LY + leptin.

Fig. 2. Effect of leptin (6 pmol, ICV) in the glucose tolerance test. (A) GTT was performed in fasted rats previously treated with leptin (30 min and 360 min before leptin ICV) and (B) GTT performed in fasted rats previously treated with either leptin (30 min before leptin) and LY294002 (3 pmol, ICV) or propranolol (10 mg/kg, IP). Graph insert: Area under curve (AUC) obtained from glucose tolerance test (GTT) shown in (B). Data are means $\pm$ SE, n = 5. * $p \leq 0.05$, leptin 30 min vs. control.

Fig. 3. Skeletal muscle JAK2 (A) and AKT (B) phosphorylation in control and leptin-treated rats. Fasted rats were sacrificed before (control), 5, 15, and 30 min after leptin injection (3 pmol, ICV). Bars show quantification

of p-JAK2 normalized by total GAPDH and p-AKT normalized by total AKT in tissue. Data are means $\pm$ SE, $n = 5$. $p \leq 0.05$, *leptin 5, **leptin 15, and #leptin 30 min vs. control.

Fig. 4. AKT phosphorylation in skeletal muscle from overnight fasted rats that received saline (control) or insulin (3 pmol) through the cava vein. LY 294002 (3 pmol, ICV), propranolol (10 mg/kg, IP), and Leptin (6 pmol, ICV) were administered 60, 30, and 30 min before insulin administration, respectively. Bars show quantification of p-AKT normalized by total AKT in tissue. Data are means $\pm$ SE, $n = 5$. $p \leq 0.05$, *B vs. control, **C vs. A, B, D, E, F and G.

Fig. 5. (A) Effects of leptin and LY294002 + leptin on PGC1 α expression, JAK2, AMPK, and ACC phosphorylation in skeletal muscle from overnight fasted rats. (B) Effect of LY294002 on PGC1 α expression, JAK2, AMPK, and ACC phosphorylation in skeletal muscle from overnight fasted rats. (C) Effect of propranolol on JAK2 phosphorylation in skeletal muscle from overnight fasted rats. LY 294002 (3 pmol, ICV) was administered 60 min before leptin (6 pmol, ICV). Propranolol (10 mg/kg, IP) was administered 30 min before leptin administration. The animals were sacrificed 30 min after leptin injection. Bars show quantification of PGC1 α , p-JAK2, p-AMPK, and p-ACC normalized by total GAPDH (internal control). Data are means $\pm$ SE, $n = 5$. $p \leq 0.05$, *leptin vs. control, LY/leptin, propranolol/leptin and propranolol.

Tab. 1

	[Serum Glucose]	[Serum Insulin]
	(mg dL ⁻¹)	(pmol L ⁻¹)
Basal (without leptin)	105 $\pm$ 9	9.2 $\pm$ 0.6
30 min after ICV leptin	98 $\pm$ 10	9.8 $\pm$ 1.5

Fig.1

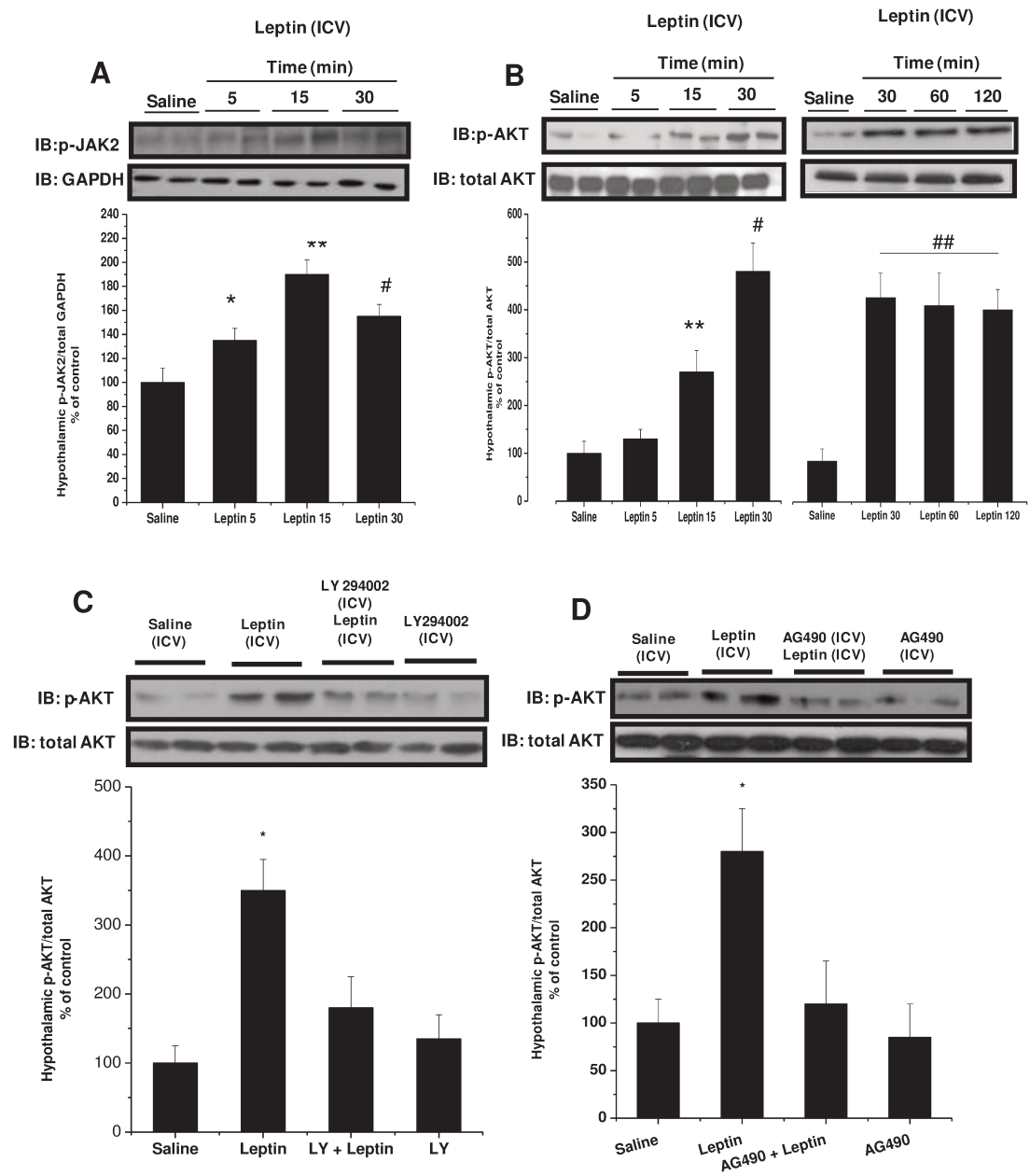
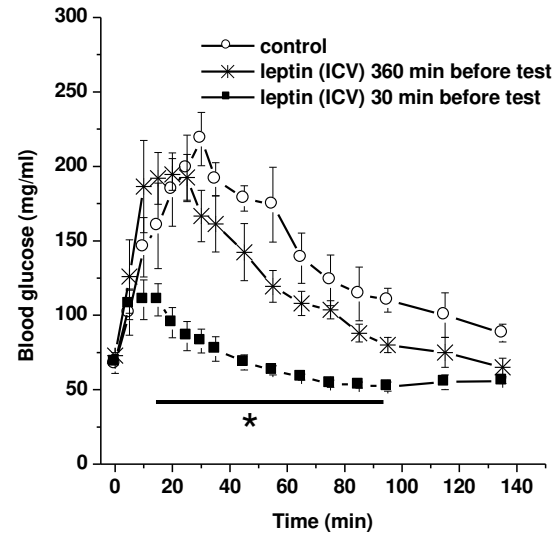


Fig.2

A



B

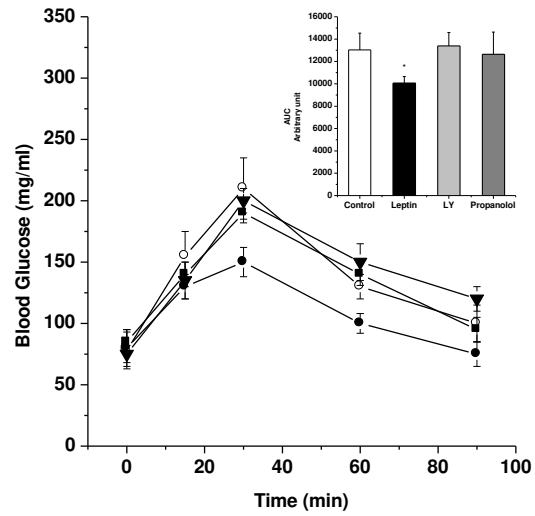
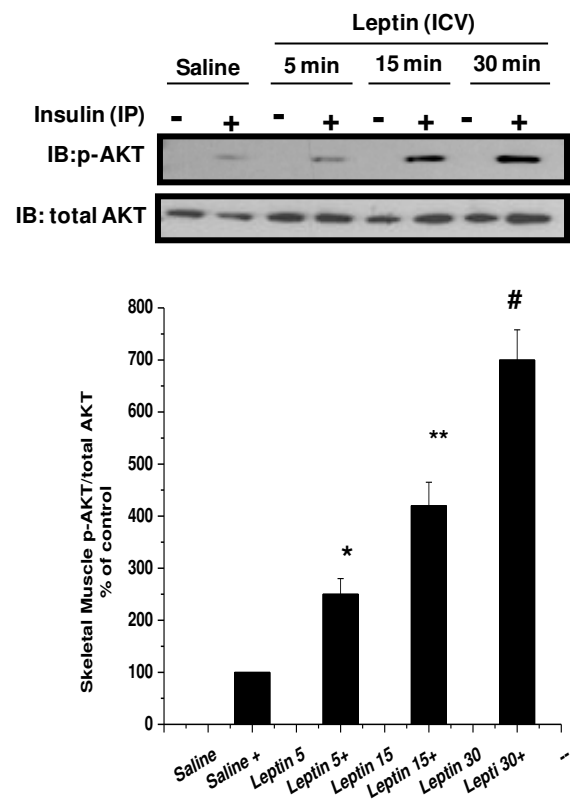


Fig. 3

A



B

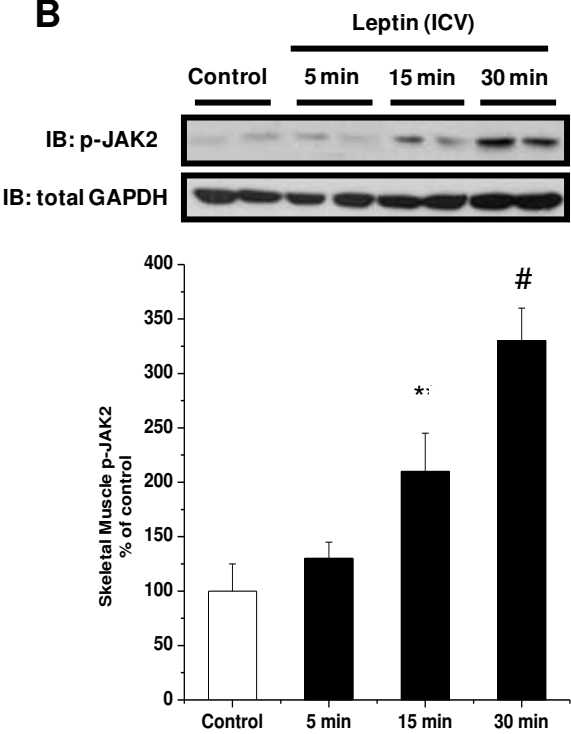


Fig. 4

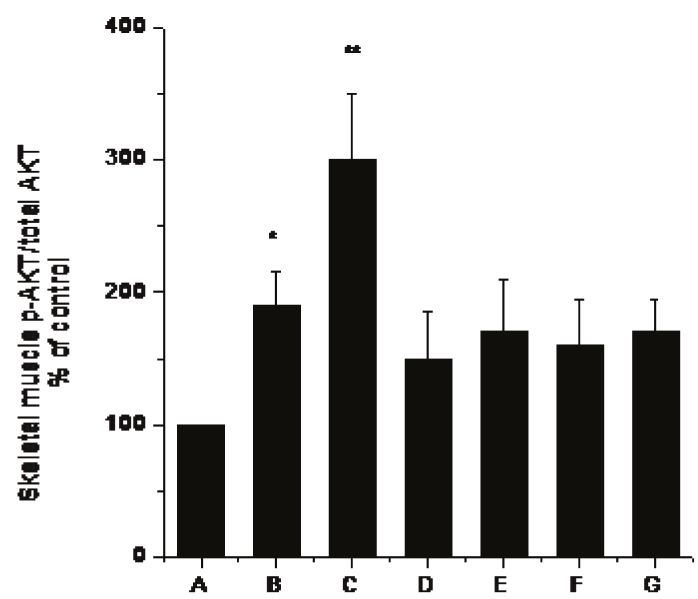
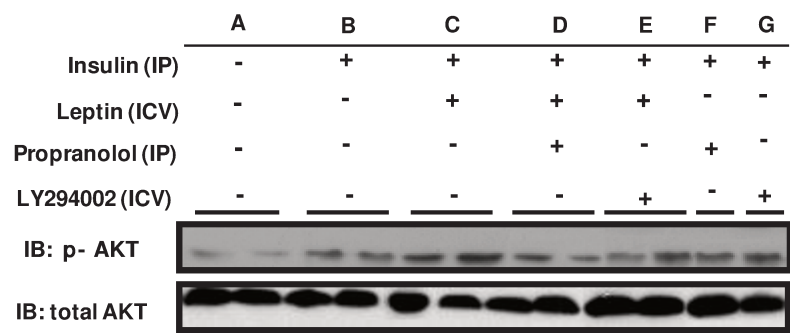
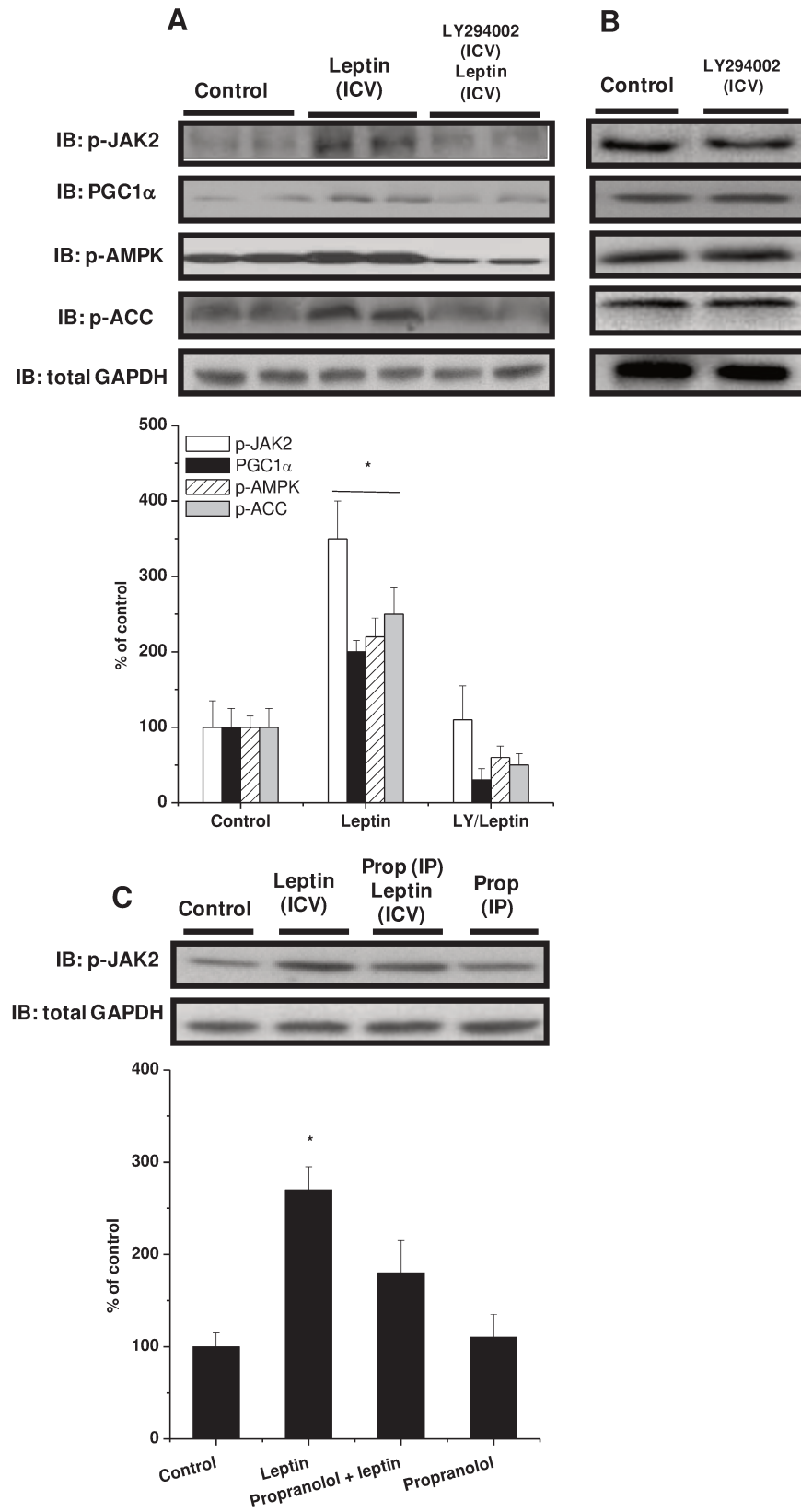


Fig. 5



3 – DISCUSSÃO GERAL

O sistema nervoso central (SNC), em especial o hipotálamo, tem sido considerado fundamental para a manutenção da homeostase energética do organismo, na medida em que esta região é capaz de integrar as informações provenientes da periferia – dadas por sinais mecânicos, endócrinos, neurais e metabólicos – e direcionar mudanças na ingestão alimentar e gasto energético (Sandoval et al., 2008). Embora a insulina e a leptina sejam os principais sinais periféricos que controlam a ingestão alimentar e o metabolismo periférico (Woods et al., 1998; Plum et al., 2006), nos últimos anos alguns trabalhos têm demonstrado que além de agir sobre a homeostase energética a leptina controla também a homeostase glicêmica (German et al., 2011) e a sensibilidade à insulina (Liu et al., 1998; Pocai et al., 2005; German et al., 2009). Estudos demonstraram que a administração de leptina diretamente no cérebro foi capaz de normalizar as concentrações de glicose sanguínea em ratos com diabetes não-controlada (Hidaka et al., 2002; Lin et al., 2002; da Silva et al., 2006; Wang et al., 2008; Kojima et al., 2009). Além disso, a sinalização aumentada da leptina no hipotálamo mostrou-se capaz de melhorar o metabolismo da glicose independente da secreção de insulina, por orquestrar de maneira coordenada a expressão de alguns genes envolvidos na captação e utilização de glicose pelo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (Hidaka et al., 2002; Lin et al., 2002; Kojima et al., 2009).

Como demonstrado por Haque et al., 1997 e Minokoshi et al., 1999, nossos estudos demonstraram que a infusão central de leptina resultou em uma melhora na tolerância à glicose, efeito que ocorreu concomitante a um aumento na fosforilação da AKT em músculo esquelético. A fosforilação desta proteína é um importante mecanismo molecular para a captação de glicose neste tecido, estimulada pela insulina, uma vez que ela é responsável pela indução da translocação do transportador transmembrana GLUT4, de vesículas presentes no citoplasma, para a membrana plasmática (Bryant et al., 2002). Contudo nossos resultados demonstraram que o aumento na

fosforilação da AKT, em músculo esquelético, não foi decorrente de uma alteração da insulinemia, uma vez que a administração hipotalâmica de leptina não é suficiente para induzir um aumento na secreção de insulina, como previamente demonstrado por Park e colaboradores (2008).

Por outro lado a administração de propranolol, um antagonista β -adrenérgico, inibiu o efeito da leptina sobre a tolerância à glicose e a fosforilação da AKT em músculo esquelético. Estes efeitos corroboram os resultados obtidos por Haque et al., 1999, nos quais o uso do propranolol inibiu a captação de glicose em músculo *soleus*. Nesse contexto a ação hipotalâmica da leptina desencadeando efeitos sobre o músculo esquelético parece ser mediada por receptores β -adrenérgicos, estimulados pelo sistema nervoso autônomo simpático (Haque et al.1999), já que a denervação simpática do tecido adiposo marrom BAT, suprimiu o efeito central da leptina sobre a captação de glicose neste tecido (Minokoshi et al., 1999). Nesse sentido, alguns estudiosos demonstraram que a administração hipotalâmica de C75, um inibidor da enzima ácido graxo sintase (FAS), com consequente aumento nas concentrações de malonil-CoA, foi capaz de aumentar a expressão de UCP3 em músculo esquelético e a utilização periférica de energia, porém estes efeitos foram bloqueados com a administração prévia de propranolol (Cha et al., 2005). Ainda que através de mecanismo molecular diferente do C75, a leptina induz um aumento nas concentrações de malonil-CoA, uma vez que a ação central desse hormônio inibe a fosforilação da quinase ativada por 5'AMP (AMPK) hipotalâmica com consequente diminuição da fosforilação e aumento da ativação da acetil-CoA carboxilase (ACC), enzima responsável pela conversão do acetil-CoA em malonil-CoA (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004; Wolfgang et al., 2007), o qual parece ser um importante sinal hipotalâmico para a ativação de vias adrenérgicas (Cha et al., 2006).

Estudos anteriores demonstraram que a administração de leptina no VMH hipotalâmico de ratos estimulou um aumento na captação de glicose majoritariamente em músculo esquelético

composto por fibras de contração lenta como o músculo *soleus*. Isto poderia ser explicado, em parte, devido à necessidade da manutenção da postura do animal que exige uma contração constante das fibras musculares e oxidativas de contração lenta (Minokoshi et al., 1999). Sabe-se que este tipo de fibra é rico em receptores adrenérgicos, em especial do subtipo β_2 que representa cerca de 80-95 % do total dos receptores β -adrenérgicos (Jensen et al., 1995; 2002). Dessa maneira acreditamos que a ativação destes receptores, particularmente o subtipo β_2 -adrenérgico, seja um mecanismo adicional no controle das vias metabólicas para a captação de glicose em músculo *soleus*.

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o músculo esquelético fosse destituído de inervações diretas, provenientes do sistema nervoso simpático, atualmente sabe-se que esta porção do sistema nervoso inerva este tecido em dois níveis: i) vasos sanguíneos; ii) fibras musculares (Barker & Saito, 1981) e a estimulação deste sistema induz a um aumento na captação de glicose em músculo esquelético, por um mecanismo independente de insulina, que como mencionado anteriormente parece ser mediado por receptores β -adrenérgicos (Vallerand et al., 1987; Liu & Stock, 1995; Tanishita et al., 1997). Alguns estudiosos demonstraram que a captação de glicose estimulada por receptores β -adrenérgicos requer a ativação da PI3K (Nevzorova et al., 2002) e que a ligação entre os receptores acoplados à proteína G e a via PI3K/AKT, em músculo esquelético, ocorre possivelmente através da proteína JAK2 (Liu et al., 2006). Adicionalmente, Liu e colaboradores (2006) demonstraram que a fosforilação da STAT3, mediada pela proteína G_α requer a ativação das proteínas quinase A (PKA), quinase c-Jun N-Terminal (JNK) e fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Recentemente Westphal et al., 2008 propôs um modelo no qual a ativação da via JAK2/STAT pelo receptor β_3 -adrenérgico seria dependente da ativação da PKA. Em nossos estudos constatamos que a administração hipotalâmica de leptina aumentou a fosforilação da JAK2 em músculo esquelético, porém a administração prévia do inibidor de PI3K (LY294002) ou propranolol

inibiu este efeito. Dessa maneira nossos resultados apontam o possível *cross-talking* entre as vias hipotalâmicas JAK2 e PI3K/AKT, induzido pela ação da leptina, como responsável pela ativação da AKT em músculo esquelético. Além disso, a ativação da JAK2 e AKT neste tecido parece ser dependente não apenas da ativação da via da PI3K hipotalâmica como também da ativação de receptores β -adrenérgicos.

Este estudo nos permitiu constatar que a ação central da leptina foi capaz de induzir um aumento na fosforilação da AMPK, ACC e expressão de PGC1 α , em músculo esquelético, de maneira dependente da ativação da PI3K hipotalâmica. Tais eventos podem ser cruciais para uma melhora na homeostase glicêmica, já que a AMPK estimula a captação de glicose, independente de insulina, por incentivar a translocação (Kurth-Kraczek et al., 1999) e o aumento da expressão de GLUT4 (Holmes et al., 1999). Além disso, esta enzima fosforila e inibe a ACC diminuindo as concentrações citoplasmáticas de malonil-CoA o que permite a translocação de ácidos graxos, via carnitina palmitoil-CoA transferase (CPT1), para o interior da mitocôndria e subsequente oxidação (Merrill et al., 1997) prevenindo assim o acúmulo de lipídios em tecidos não adiposos (Winder & Hardie, 1996; Minokoshi et al., 2002). Outro aspecto importante da AMPK é a capacidade que esta enzima tem de aumentar a biogênese mitocondrial (Winder et al., 2000), aumentando dessa maneira a capacidade dos tecidos para a produção aeróbica de ATP (Hardie et al., 2006). Tal capacidade parece estar atrelada ao fato de a AMPK estimular a expressão (Irrcher et al., 2009) e a fosforilação do PGC1 α (Jäger et al., 2007). Este coativador de transcrição por sua vez facilita a captação e a utilização da glicose por aumentar a expressão de genes relacionados à fosforilação oxidativa (Mootha et al., 2004). Adicionalmente, Lin e colaboradores (2002) demonstraram que a alta expressão de PGC1 α em camundongos transgênicos foi capaz de induzir a substituição das fibras glicolíticas de contração rápida para as fibras oxidativas de contração lenta.

Embora o fenômeno fisiológico, de ação hipotalâmica da leptina sobre o metabolismo glicêmico em músculo esquelético, tenha sido descrito há algum tempo os mecanismos moleculares que permitem esta ligação não foram completamente elucidados. Com o objetivo de identificar as proteínas relacionadas a esse evento nós inibimos, no hipotálamo, duas importantes proteínas que compõem a via de sinalização da leptina: a JAK2 (AG490) e a PI3K (LY294002). Utilizando-se dessa estratégia constatamos que a administração desses bloqueadores inibiu a fosforilação da AKT hipotalâmica, quando administrados antes da leptina. Além disso, estas drogas impediram a ação hipotalâmica da leptina sobre a ativação da via AMPK/ACC e a elevação da expressão de PGC1 α em músculo esquelético. Ainda, a administração intracerebroventricular do bloqueador da PI3K (LY294002) ou mesmo a infusão intraperitoneal do inibidor de receptores β -adrenérgicos bloquearam a fosforilação da AKT em músculo esquelético além de diminuir a tolerância à glicose. Evidenciando mais uma vez que a via de sinalização PI3K/AKT no hipotálamo é fundamental para a transdução das mudanças do tônus simpático – que inerva o músculo esquelético – desencadeadas pela ação central da leptina, à semelhança do que ocorre com a atividade simpática renal (Rahmouni et al., 2003).

O presente estudo demonstrou que a ação hipotalâmica da leptina é capaz de estimular a fosforilação e modular a ativação das proteínas JAK2, AKT, AMPK e ACC, além de aumentar o conteúdo protéico de PGC1 α em músculo esquelético e induzir uma melhora na tolerância à glicose de maneira dependente da PI3K hipotalâmica. Estes resultados nos possibilitam concluir que a resistência central à sinalização da leptina pode contribuir para uma reduzida ativação da AMPK e PGC1 α em músculo esquelético, levando a uma diminuição no metabolismo oxidativo o que contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina e em última análise do diabetes mellitus do tipo 2.

4 – CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste estudo nos levam às seguintes conclusões:

- i) A fosforilação e ativação da JAK2 e AKT na musculatura esquelética, a partir da ação central da leptina, desempenham importante papel na modulação da homeostase glicêmica por este hormônio.
- ii) A ação central da leptina é capaz de aumentar o conteúdo protéico de PGC1 α , promover a ativação da AMPK e a inibição da ACC em músculo esquelético. Esta condição favorece o metabolismo oxidativo de ácidos graxos e pode reduzir o efeito “lipotóxico” nos músculos.
- iii) A leptina exerce seu efeito no hipotálamo atuando sobre a sinalização na musculatura esquelética através de um mecanismo dependente da PI3K hipotalâmica.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, Vanitalli TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. **JAMA** 1999; 282:1530-8.

Amos AF. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. **Diabet Med** 1997; 14(5):S1-85.

Anand BK & Brobeck JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. **Proceedings Soc for Exp Biol Med** 1951; 77:323-4.

Anderson RN, Smith BL. Deaths: leading causes for 2001. **Natl Vital Stat Rep** 2003; 52:1-85.

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. **J Biol Chem** 2004; 279(13):12005-8.

Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. **Neuropeptides** 2006; 40(6):375-401.

Asilmaz E, Cohen P, Miyazaki M, Dobrzyn P, Ueki K, Fayzikhodjaeva G et al. Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. **J Clin Invest** 2004; 113(3):414-24.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte Jr D. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. **J Clin Invest** 1967; 46(10):1549-67.

Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V et al. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. **Neuron** 2004; 42(6):983-91.

Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. **J Biol Chem** 2000; 275(19):14563-72.

Barker D, Saito M. Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 1981; 212(1188):317-32.

Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. **J Clin Invest** 1997; 100(12):3105-10.

Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. **Diabetes** 1999; 48(4):828-33.

Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. **Trends Neurosci** 1988; 11(3):107-11.

Bates SH, Gardiner JV, Jones RB, Bloom SR, Bailey CJ. Acute stimulation of glucose uptake by leptin in I6 muscle cells. **Horm Metab Res** 2002; 34(3):111-5.

Bates SH, Kulkarni RN, Seifert M, Myers MG Jr. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. **Cell Metab** 2005; 1(3):169-78.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature** 2003; 421(6925):856-9.

Bernard C. Leçons de physiologie expérimentale appliquées à La médecine. Eds Baillière et Fils, Paris, 1854.

Bertelli DF, Ueno M, Amaral ME, Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S et al. Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2003; 284(4):E679-87.

Berthoud HR, Jeanrenaud B. Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats. **Endocrinology** 1979; 105: 146-51.

Berti L, Kellerer M, Capp E, Häring HU. Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. **Diabetologia** 1997; 40(5):606-9.

Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **J Biol Chem** 1997; 272(51):32686-95.

Bjørbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL et al. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. **Endocrinology** 1998; 139(8):3485-91.

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

Blüher S, Mantzoros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. **Am J Clin Nutr** 2009; 89(3):991S-997S.

Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 2003; 111(3):121-4.

Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes** 1997; 46:3-10.

Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. **Curr Diab Rep** 2006; 6:177-81.

Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. **Diabetes Care** 2000; 23:465-71.

Bray GA. History of Obesity. Chapter 1, Obesity: Science to Practice. **John Wiley & Sons, Ltd** 2009; 1-18.

Brennan AM & Mantzoros. Drug insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology – emerging clinical applications. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab** 2006; 2(6):318-27.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science** 2000; 289:2122-5.

Caldefie-Chezet F, Poulin A, Vasson MP. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. **Free Radic Res** 2003; 37(8):809-14.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. **N Engl J Med** 2003; 348:1625-38.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science** 1995; 269(5223):546-9.

Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA et al. Body fat distribution and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. **Am J Epidemiol** 1997; 145:614-9.

Carling D, Fryer LG, Woods A, Daniel T, Jarvie SL, Whitrow H. Bypassing the glucose/fatty acid cycle: AMP-activated protein kinase. **Biochem Soc Trans** 2003; 31(Pt 6):1157-60.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2002; 46(4):419-25.

Ceddia RB, William WN Jr, Curi R. Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. **Int J Obes Relat Metab Disord** 1999; 23(1):75-82.

Cha SH, Hu Z, Chohann S, Lane MD. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci** 2005; 102(41):14557-62.

Cha SH, Rodgers JT, Puigserver P, Chohann S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1alpha. **Proc Natl Acad Sci** 2006; 103(42):15410-5.

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. **Diabetes Care** 1995; 17:961-9.

Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nat Genet** 1996; 12(3):318-20.

Cherrington AD. Control of glucose uptake and release by liver *in vivo*. **Diabetes** 1999; 48:1198-214.

Chinookoswong N, Wang JL, Shi ZQ. Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. **Diabetes** 1999; 48(7):1487-92.

Chung WK, Leibel RL. Considerations regarding the genetics of obesity. **Obesity** (Silver Spring) 2008; 16:S33-9.

Clark K. The nude. London, **Penguin Books** 1964; 87.

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Ann Intern Med** 1995; 122:481-6.

Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. **Nature** 1996; 380(6576):677.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal weight and obese human. **N Engl J Med** 1996; 334(5):292-5.

Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. **Cell Metab** 2005; 1(1):63-72.

Costa A, Poma A, Martignoni E, Nappi G, Ur E, Grossman A. Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. **Neuroreport** 1997; 8(5):1131-4.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature** 2001; 411(6836):480-4.

Curi R, Newsholme P, Newsholme EA. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. **Biochem J** 1988; 250(2):383-8.

Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS. Leptin in human physiology and therapeutics. **Front Neuroendocrinol** 2010; 31(3):377-93.

Da Silva AA, Tallam LS, Liu J, Hall JE. Chronic antidiabetic and cardiovascular actions of leptin: role of CNS and increased adrenergic activity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2006; 291:R1275-82.

De Fronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes** 1981; 30:1000-7.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. **Diabetologia** 1992; 35:389-97.

Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. **Neuron** 2006; 49(2):191-203.

Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. **Diabetes** 2001; 50(1):123-30.

Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander HS, Murray CJ. The Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet** 2002; 360:1347-60.

Fain JN, Madan Ak, Hiller ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology** 2004; 145:2273-82.

Farag MK, Gaballa MR. Diabetes: an overview of a rising epidemic. **Nephrol Dial Transplant** 2011; 26:28-35.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. **N Engl J Med** 1999; 341(12):879-84.

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1997 Jun 24;94(13):7001-5.

Finkelstein EA, Trogdon JG, Cohen JW, Dietz W. Annual medical spending attributable to obesity: payer- and service-specific estimates. **Health Aff (Millwood)** 2009; 28:w822-31.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet** 2001; 357:557-67.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. **JAMA** 2010; 303(3):235-41.

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

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med** 1995; 1(12):1311-4.

Fukushima M, Tokunaga K, Lupien J, Kemnitz JW, Bray GA. Dynamic and static phases of obesity following lesions in PVN and VMH. **Am J Physiol** 1987; R523-9.

Furler SM, Poynten AM, Kriketos AD, Lowy AJ, Ellis BA, Maclean EL et al. Independent influences of central fat and skeletal muscle lipids on insulin sensitivity. **Obes Res** 2001; 9:535-43.

Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101(13):4661-6.

Gao Q, Horvath TL. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2008; 294(5):E817-26.

Gelling RW, Morton GJ, Morrison CD, Niswender KD, Myers Jr MG, Rhodes CJ et al. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. **Cell Metab** 2006; 3:67-73.

German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW et al. Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. **Endocrinology** 2009; 150(10):4502-11.

Girasol A, Albuquerque GG, Mansour E, Araújo EP, Degasperi G, Denis RG et al. Fyn mediates leptin actions in the thymus of rodents. **PLoS One** 2009 3; 4(11):e7707.

Gong L, Yao F, Hockman K, Heng HH, Morton GJ, Takeda K et al. Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. **Endocrinology** 2008; 149(7):3346-54.

Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. **Diabetes** 1997; 46(10):1579-85.

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes** 1999; 48(6):1270-4.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science** 1995; 269(5223):543-6.

Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept. **J Physiol** 2006; 574(1):7-15.

Harris TB, Ballard-Barbasch R, Madans J, Makuc DM, Feldman JJ. Overweight, weight loss, and risk of coronary heart disease in older women. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. **Am J Epidemiol** 1993; 137:1318-27.

Harris RB. Acute and chronic effects of leptin on glucose utilization in lean mice. **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 245(2):502-9.

Hekerman P, Zeidler J, Bamberg-Lemper S, Knobelspies H, Lavens D, Tavernier J et al. Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. **FEBS J** 2005; 272(1):109-19.

- Hetherington A & Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat Record** 1940; 78: 149-72.
- Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Tsuruta Y, Oka K, Noguchi H et al. Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. **FASEB J** 2002; 16:509-18.
- Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. **J Appl Physiol** 1999; 87(5):1990-5.
- Hossain P, Kavar B, Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge. **N Engl Med** 2007; 356(3):213-5.
- Hübschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S, Meyerhof W. Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. **J Neurosci** 2001; 21(7):2413-24.
- Iguchi A, Burleson PD, Szabo AJ. Decrease in plasma glucose concentration after microinjection of insulin into VMN. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 1981; 240:E95-100.
- Inoue S, Bray GA, Mullen YS. Transplantation of pancreatic β -cells prevents development of hypothalamic obesity in rats. **Am J Physiol** 1978; 235: E266-71.
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Weight control and physical activity. In: Vainio H, Bianchini F, eds. **International Agency for Research on Cancer handbooks of cancer prevention** 2002; Vol 6. Lyon, France: IARC Press.
- International Agency for Research on Cancer. Weight control and physical activity. Lyon: **International Agency for Research on Cancer** 2002; (6)1-315.
- Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1(alpha) transcription in skeletal muscle cells. **Am J Cell Physiol** 2009; 296:C116-23.
- Jager S, Handschin C, St Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC1-alpha. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:12017-22.
- Jensen J, Brennesvik EO, Bergersen H, Oseland H, Jebens E, Brørs O. Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles. **Pflugers Arch** 2002; 444(1-2):213-9.
- Jensen J, Brørs O, Dahl HA. Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types. **Pharmacol Toxicol** 1995; 76(6):380-5.
- Kahn BB e Flier JS. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest** 2000; 106(4):473-81.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care** 2005; 28(9):2289-304.
- Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and B-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. **Diabetes** 1993; 42:1663-72.
- Kahn SE. The importance of B-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:4047-58.

Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. **Nature** 1997; 389(6649):374-7.

Kannel WB, Plehn JF, Cupples LA. Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study. **Am Heart J** 1988; 115:869-75.

Keen-Rhinehart E, Kalra SP, Kalra PS. AAV-mediated leptin receptor installation improves energy balance and the reproductive status of obese female Koletsky rats. **Peptides** 2005; 26(12):2567-78.

Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Häring HU. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. **Diabetologia** 1997; 40(11):1358-62.

Kennedy G. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** 1953; 140:578-92.

Kim JK, Wi JK, Youn JH. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. **Diabetes** 1996; 45(5):651-8.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care** 1998; 21: 1414-31.

Klein R. Eat fat. New York, **Vintage Books** 1996; 39-123.

Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E et al. Brain glucagon-like-peptide-1 increase insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. **J Clin Invest** 2005; 115:3554-63.

Kojima S, Asakawa A, Amitani H, Sakoguchi T, Ueno N, Inui A, Kalra SP. Central leptin gene therapy, a substitute for insulin therapy to ameliorate hyperglycemia and hyperphagia, and promote survival in insulin-deficient diabetic mice. **Peptides** 2009; 30:962-6.

Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. **Diabetes** 1991; 40(11):1397-403.

Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Yano W, Suzuki R, Ueki K et al. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. **J Clin Invest** 2004; 114(7):917-27.

Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. **Diabetes** 1999; 48(8):1667-71.

Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Rossetti L. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. **Science** 2005; 309:943-7.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature** 1996; 379(6566):632-5.

Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology** 1997; 138(6):2569-76.

Lemieux S, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Seven year changes in body fat and visceral adipose tissue in women, association with indices of plasma glucose-insulin homeostasis. **Diabetes Care** 1996; 19:983-91.

Li C, Friedman JM. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96(17):9677-82.

Licinio J, Mantzoros C, Negrão AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. **Nat Med** 1997; 3(5):575-9.

Lin CY, Higginbotham DA, Judd RL, White BD. Central leptin increases insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2002; 282:E1084-91.

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O et al. Transcriptional co-activator PGC1- α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature** 2002; 418:797-801.

Lin X, Taguchi A, Park S, Kushner JA, Li F, Li Y et al. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. **J Clin Invest** 2004; 114(7):908-16.

Ling C, Groop L. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. **Diabetes** 2009; 58:2718-25.

Litré E. Hippocrates. Oeuvres Complètes d'Hippocrate. Traduction nouvelle avec le texte grec, **JB Baillière** 1839, Paris.

Liu AM, Lo RK, Wong CS, Morris C, Wise H, Wong YH. Activation of STAT3 by G α (s) distinctively requires protein kinase A, JNK, and phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem** 2006; 281(47):35812-25.

Liu L, Karkanas GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J et al. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. **J Biol Chem** 1998; 273(47):31160-7.

Liu YL, Stock MJ. Acute effects of the beta 3-adrenoceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilisation. **Br J Pharmacol** 1995; 114(4):888-94.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature** 1998; 394(6696):897-901.

Ma R & Chan J. Metabolic complications of obesity. Chapter 10, Obesity: Science to Practice. **John Wiley & Sons Ltd** 2009; 235-70.

Mansour E, Pereira FG, Araújo EP, Amaral ME, Morari J, Ferraroni NR et al. Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. **Endocrinology** 2006; 147(11):5470-9.

Mantzoros CS, Qu D, Frederich RC, Susulic VS, Lowell BB, Maratos-Flier E et al. Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. **Diabetes** 1996; 45(7):909-14.

Mantzoros CS, Frederich RC, Qu D, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS. Severe leptin resistance in brown fat-deficient uncoupling protein promoter-driven diphtheria toxin A mice despite suppression of hypothalamic neuropeptide Y and circulating corticosterone concentrations. **Diabetes** 1998; 47(2):230-8. Erratum in: **Diabetes** 1998 May;47(5):855.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **Int J Obes Relat Metab Disord** 2002; 26(11):1407-33.

Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. **J Immunol** 2005; 174(6):3137-42.

McCowen KC, Chow JC, Smith RJ. Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo. **Endocrinology** 1998; 139(11):4442-7.

McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. **Diabetes** 2002; 51(1):7-18.

Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **Am J Physiol** 1997; 273(6 Pt 1):E1107-12.

Minokoshi Y, Haque MS, Shimazu T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. **Diabetes** 1999; 48(2):287-91.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature** 2002; 415(6869):339-43.

Minokoshi Y, Kahn BB. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. **Biochem Soc Trans** 2003; 31(Pt 1):196-201.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature** 2004; 428(6982):569-74.

Mitrakou A, Kelly D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. **N Engl J Med** 1992; 326:22-9.

Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. **Diabetes** 1997; 46(3):342-7.

Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S et al. Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:6570-5.

Morrison CD. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? **Biochim Biophys Acta**;1792(5):401-8.

Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. **Cell Metab** 2005; 2(6):411-20.

Morton GJ. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. **J Physiol** 2007; 583(2):437-43.

Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. **Biochem Soc Trans** 2002; 30(Pt 6):1059-64.

Münzberg H, Jobst EE, Bates SH, Jones J, Villanueva E, Leshan R et al. Appropriate inhibition of orexigenic hypothalamic arcuate nucleus neurons independently of leptin receptor/STAT3 signaling. **J Neurosci** 2007; 27(1):69-74.

Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annu Rev Physiol** 2008; 70:537-56.

Ni Mhurchu C, Rodgers A, Pan WH, Gu DF, Woodward M. Body Mass index and cardiovascular disease in the Asia-Pacific Region: an overview of 33 cohorts involving 310 000 participants. **Int J Epidemiol** 2004; 33:751-8.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. **Nature** 2001; 413(6858):794-5.

Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. **Diabetes** 2003; 52(2):227-31.

Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes** 1997; 46(11):1768-74.

Obici S & Rossetti L. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. **Endocrinology** 2003; 144:5172-8.

Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. **Nat Neurosci** 2002; 5:566-72.

Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. **Diabetes** 2002; 51:271-5.

Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. **Nature Med** 2002; 8:1376-82.

Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. **J Immunol** 2006; 176(12):7745-52.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science** 1995; 269:540-3.

Pereira-da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. **Endocrinology** 2003; 144(11):4831-40.

Perley M, Kipnis DM. Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. **Diabetes** 1966; 15:867-74.

Pierroz DD, Ziotopoulou M, Ungsuan L, Moschos S, Flier JS, Mantzoros CS. Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. **Diabetes** 2002; 51(5):1337-45.

Plum L, Belgardt BF, Bruning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. **J Clin Invest** 2006; 116:1761-6.

Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J et al. Hypothalamic KATP channels control hepatic glucose production. **Nature** 2005; 434:1026-31.

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Despesas, rendimentos e condições de vida. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)** 2010;1-222.

Polonski KS, Given BD, Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. **J Clin Invest** 1988; 81:442-8.

Popkin BM. The nutrition transition and its health implications in lower-income countries. **Public Health Nutr** 1998; 1:5-21.

Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. **Lancet** 2009; 373:1083-96.

Rabkin SW, Mathewson FA, Hsu PH. Relation of body weight to development of ischemic heart disease in a cohort of young North American men after a 26 year observation period: The Manitoba Study. **Am J Cardiol** 1977; 39:452-8.

Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA & Mark AL 2003 Intracellular mechanisms involved in leptin regulation of sympathetic outflow. **Hypertension** 41 763-767.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet** 1963; i:785-9.

Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 2004; 27: 2568-9.

Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO. Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima indians. **Diabetes Care** 1994; 17:1067-74.

Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate and insulin for 24 h in patients with NIDDM. **Diabetes** 1988; 37:1020-4.

Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. **Physiol Rev** 1995; 75:473-86.

Reeves C. Egyptian medicine. London, **Shire Publications** 1992.

Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care** 1997; 20:1183-97.

Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA et al. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. **Am J Epidemiol** 1995; 141:1117-27.

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R et al. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. **Mol Endocrinol** 2001; 15(10):1748-57.

Roden M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News Physiol Sci** 2004; 19:92-6.

Rogge G, Jones D, Hubert GW, Lin Y, Kuhar MJ. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. **Nat Rev Neurosci** 2008; 9(10):747-58.

Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82(2):579-84.

- Saltiel AR & Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends Cell Biol** 2002; 12(2):65-71.
- Sandoval DA, Obici S, Seeley RJ. Targeting the CNS to treat type 2 diabetes. **Nature** 2009; 8:386-97.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. **Science** 2007; 316:1331-6.
- Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tümer N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. **Am J Physiol** 1997; 273(1 Pt 1):E226-30.
- Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes** 2006; 55:1537-45.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte Jr D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. **Endocr Rev** 1992; 13:387-414.
- Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes** 1996; 45:531-35.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. **Nature** 2000; 404(6778):661-71.
- Schwartz M, Porte Jr D. Diabetes, obesity, and the brain. **Science** 2005; 307:375-9.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science** 2007; 316:1341-5.
- Seidell JC, Verschuren WM, van Leer EM, Kromhout D. Overweight, underweight, and mortality. A prospective study of 48,287 men and women. **Arch Intern Med** 1996; 156:958-63.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract** 2010; 87: 4-14.
- Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. **Nature** 1999; 401(6748):73-6.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest** 2006; 116:1793-801.
- Short T. A discourse concerning the causes and effects of corpulency together with the method for its prevention and cure. London, **J. Robert** 1727.
- Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **N Engl J Med** 1990; 322:223-8.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest** 2000; 106:171-6.
- Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. **J Clin Invest** 1996; 97(5):1344-47.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature** 2007; 445:881-5.
- Smith PM, Ferguson AV. Neurophysiology of hunger and satiety. **Dev Disabil Res Rev** 2008; 14(2):96-104.

Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. **Nature** 1997; 390(6659):521-5.

Spivey N. How art made the world. London, **BBC Books** 2005; 57-60.

Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. **Life Sci** 1984; 35(26):2635-42.

Stern MP. The insulin resistance syndrome. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds. International textbook of diabetes mellitus, Vol 2. Chichester: **John Wiley & Sons** 1997:255-83.

Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM. Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. **Nat Neurosci** 2005; 8(10):1356-63.

Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. **Diabetes** 1991; 40(2):280-9.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. **Lancet** 2008; 371:2153-6.

Tanishita T, Shimizu Y, Minokoshi Y, Shimazu T. The beta3-adrenergic agonist BRL37344 increases glucose transport into L6 myocytes through a mechanism different from that of insulin. **J Biochem** 1997; 122(1):90-5.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. 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(10):6093-6.

Toda C, Shiuchi T, Lee S, Yamato-Esaki M, Fujino Y, Suzuki A et al. Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. **Diabetes** 2009; 58(12):2757-65.

Tung YC, Ma M, Piper S, Coll A, O'Rahilly S, Yeo GS. Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus. **J Neurosci** 2008; 28(47):12419-26.

Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96(5):2327-32.

Unger RH. Mini review: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. **Endocrinology** 2003; 144(12):5159-65.

Unwin N, Harland J, White M, Bhopal R, Winocour P, Stephenson P et al. Body mass index, waist circumference, waist-hip ratio and glucose intolerance in Chinese and European adults in Newcastle, UK. **J Epidemiol Community Health** 1997; 51:160-6.

US Department of Health and Human Services. The surgeon general's call to action to prevent and decrease overweight and obesity. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, **Office of the Surgeon General** 2001.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat Genet** 1996; 14(1):95-7.

Vallerand AL, Pérusse F, Bukowiecki LJ. Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake. **Am J Physiol** 1987; 253(2 Pt 1):E179-86.

Wallis MG, Appleby GJ, Youd JM, Clark MG, Penschow JD. Reduced glycogen phosphorylase activity in denervated hindlimb muscles of rat is related to muscle atrophy and fibre type. **Life Sci** 1999; 64(4):221-8.

Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. **Am J Clin Nutr** 2005; 81:555-63.

Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyika SK. Will all Americans become overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. **Obesity** 2008; 16:2323-30.

Wang J, Wemette CM, Judd RL, Huggins KW, White BD. Guanethidine treatment does not block the ability of central leptin administration to decrease blood glucose concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Endocrinol** 2008; 198:541-8.

Wat NM, Lam TH, Janus ED, Lam KS. Central obesity predicts the worsening of glycaemia in southern Chinese. **Int J Obes Relat Metab Disord** 2001; 25: 1789-93.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest** 2005; 115:1111-19.

Westphal S, Perwitz N, Iwen KA, Kraus D, Schick R, Fasshauer M et al. Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by beta-adrenergic stimulation of JAK/STAT. **Horm Metab Res** 2008; 40(3):165-71.

Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. **Am J Physiol** 1996; 270:E299-304.

Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 2000; 88:2219-26.

Winder WW. Roles of adenosine monophosphate-activated protein kinase in skeletal muscle: fatty acid oxidation, glucose transport, and gene regulation. **Curr Op in Endocrinol & Diab** 2001; 8(4):180-5.

Winder WW, Hardie DG, Mustard KJ, Greenwood LJ, Paxton BE, Park SH et al. Long-term regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase in skeletal muscle. **Biochem Soc Trans** 2003; 31(Pt 1):182-5.

Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and Cancer. **The Oncologist** 2010; 15:556-65.

Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte Jr D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature** 1979; 282:503-5.

Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr D, Schwartz MW. Signals that regulates food intake and energy homeostasis. **Science** 1998; 280: 1378-83.

World Health Organization. Diabetes Mellitus. Report of a WHO Study Group. WHO **Technical Report Series** 1985; N° 727.

World Health Organization. Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. **Technical Report Series** 1995; 854. Geneva, OMS. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.

World Health Organization (2005) Preventing chronic diseases – a vital investment. http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/en/index.html, (last accessed 1 June 2006).

World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: **World Health Organization**, 2009.

World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/topics/obesity/en/>. Último acesso em 03/2011.

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(4):951-8.

Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. **N Engl J Med** 2010; 362: 1090-101.

Yoon KH, Lee JH, Kim JW, Cho JH, Choi YH, Ko SH et al. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. **Lancet** 2006; 368:1681-8.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J Biol Chem** 2002; 277(52):50230-6.

Yu X, Park BH, Wang MY, Wang ZV, Unger RH. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105(37):14070-5.

Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. **FEBS Lett** 2003; 546(1):45-50.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. **Science** 2007; 316:1336-41.

Zeggini E, Scott LJ, Saxena R et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. **Nat Genet** 2008; 40:638-45.

Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. **Nature** 1997; 387(6629):206-9.

Zhang R, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature** 1994; 372(6505):425-32.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature** 2001; 414:782-7.

6 – APÊNDICE



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1800-1, sobre "Modulação do metabolismo muscular da glicose pela ação hipotalâmica de leptina", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni / Erika Anne de Freitas Robles Roman, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

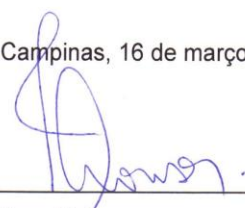
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1800-1, entitled "Modulation of glucose metabolism in muscle by the leptin hypothalamic action", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ARTIGOS PUBLICADOS

- 01) Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus. Solon CS, Franci D, Ignácio-Souza LM, Romanatto T, **Roman EA**, Arruda AP, Torsoni AS, Carneiro EM, Velloso LA. **Amino Acids Journal** 2011. [Epub ahead of print]
- 02) Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, **Roman EA**, Velloso LA, Torsoni AS, Torsoni MA. **J Nutr Biochem** 2011. [Epub ahead of print].
- 03) The role of proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. Morari J, Torsoni AS, Anhe GF, **Roman EA**, Cintra DE, Ward LS, Bordin S, Velloso LA. **Metabolism** 2010; 59(2):215-23.
- 04) **Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism.** **Roman EA**, Reis D, Romanatto T, Maimoni D, Ferreira EA, Santos GA, Torsoni AS, Velloso LA, Torsoni MA. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 314(1):62-9.
- 05) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, **Roman EA**, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA. **PLoS One** 2009; 4(4):e5045.
- 06) Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. Romanatto T, **Roman EA**, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperis GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA. **J Biol Chem** 2009; 284(52):36213-22.
- 07) Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling. Stoppa GR, Cesquini M, **Roman EA**, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, Saad MJ, Velloso LA, Torsoni MA. **J Endocrinol** 2008; 198(1):157-68.
- 08) TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, **Roman EA**, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA. **Peptides** 2007; 28(5):1050-8.

ARTIGOS SUBMETIDOS

- 01) Inhibition of hypothalamic inflammation reverts diet-induced insulin resistance in the liver. Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignácio-Souza LM, **Roman EA**, Romanatto T, Pascoal LB, Torsoni MA, Prada PO, Saad MJ, Velloso LA. **Diabetes**.
- 02) Hypothalamic action of glutamate leads to body mass reduction through a mechanism partially dependent on JAK2. Razolli DS, Solon C, **Roman EA**, Ignácio-Souza LM, Velloso LA. **Journal of Cellular Physiology**.
- 03) Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increase in corticosterone levels. Kinote A, **Roman EA**, Solon C, Ignácio-Souza LM, Solon CS, Faria JA, Araújo TM, Lima APB, Lellis-Santos C, Velloso LA, Bordin Silvana, Anhe GF. **Diabetes**.

PRINCIPAIS TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- 01) Fructose-induced AMPK activation in the Hypothalamus contributes to increased gluconeogenesis and hepatic PEPCK expression. Kinote A, **Roman EA**, Sollon C, Solon C, Matos T, Souza I, Nascimento LR, Velloso LA, Anê GF. *71st American Diabetes Association*. Diabetes 2011; 60(1):A26. **San Diego – Estados Unidos. Apresentação oral.**
- 02) Hypothalamic leptin improves mitochondrial function in soleus muscle: The role of PI3K signalling. **Roman EA**, Arruda AP, Romanatto T, Solon CS, Morari J, Nuñez CEC, Velloso LA, Torsoni MA. *46th The European Association for the Study of Diabetes*. Diabetologia 2010; 53(1):S111. **Estocolmo – Suécia. Apresentação Oral.**
- 03) Insulin resistance and endoplasmic reticulum stress in male offspring from dams fed high fat diet during pregnancy and lactation. Torsoni AS, Martins JC, Ashino NG, **Roman EA**, Velloso LA, Torsoni MA. *Cell Symposia - Inflammation and Disease*. 2010. Lisboa-Portugal.
- 04) Reduction of endoplasmic reticulum stress markers in adipose tissue of diabetes and insulin resistant patients undergoing body mass loss. Nuñez CEC, **Roman EA**, Geloneze B, Pareja JC, Velloso LA, Araújo EP. *Cell Symposia - Inflammation and Disease*. 2010. Lisboa-Portugal.
- 05) Avaliação da expressão de neurotransmissores hipotalâmicos e gasto energético em modelos animais de obesidade induzida por dieta. Solon CS, Arruda AP, **Roman EA**, Romanatto T, Velloso LA. *29º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. 2010; 54(5). Gramado – RS.
- 06) Controle da expressão de neurotransmissores hipotalâmicos na homeostase energética por meio do receptor NMDA. Razolli DS, **Roman EA**, Solon CS, Velloso LA. *29º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. 2010; 54(5). Gramado – RS.
- 07) Leptina intracerebroventricular aumenta a atividade da citrato sintase, o nível do citocromo c, a respiração mitocondrial e a fosforilação da AKT em músculo esquelético: a importância do sinal adrenérgico e da ativação da JAK2. **Roman EA**, Arruda AP, Romanatto T, Santos GA, Solon C, Morari J, Nuñez CEC, Velloso LA, Torsoni MA. *9º Congresso Paulista de Diabetes e Metabologia*. 2010; 52(2):S111. Águas de São Pedro – SP.
- 08) Avaliação da distribuição dos diferentes subtipos do receptor glutamatérgico NMDA (N-Metil-D-Aspartato) em hipotálamo de ratos. Razolli DS, **Roman EA**, Solon CS, Morari J, Moraes JC, Velloso LA. *4ª Semana da Pesquisa FCM/UNICAMP*. 2010. Campinas – SP.
- 09) Avaliação da expressão de neurotransmissores hipotalâmicos em modelos animais de obesidade induzida por dieta. Solon CS, Arruda AP, **Roman EA**, Romanatto T, Velloso LA. *4ª Semana da Pesquisa FCM/UNICAMP*. 2010. Campinas – SP.
- 10) Intracerebroventricular leptin increase AKT phosphorylation stimulated by insulin in skeletal muscle: the role of adrenergic signal and JAK2 activation. **Roman EA**, Reis D, Romanatto T, Maimoni D, Solon CS, Morari J, Velloso LA, Torsoni MA. *11th European Congress of Endocrinology*. 2009. Istanbul – Turquia. **(Entre os dez melhores trabalhos da área de ciência básica)**
- 11) TNFR-1 knockout protects against diet induced obesity. Romanatto T, **Roman EA**, Denis R, Arruda AP, Milanski M, Degasperi GR, Solon CS, Velloso LA. *11th European Congress of Endocrinology*. 2009. Istanbul – Turquia. **(Melhor trabalho da área de ciência básica).**
- 12) Avaliação da participação do PGC-1 α no controle da transcrição do gene da interleucina-10 (IL-10) em hepatócitos de ratos submetidos ao tratamento com ácidos graxos. Morari J, Torsoni AS, Solon CS, **Roman EA**, Romanatto T, Degasperi GR, Velloso LA. *8º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo*. 2008; 52:176. Águas de Lindóia – SP.
- 13) Controle da Ingestão alimentar através do receptor de TNF (TNFR-1). Romanatto T, Degasperi GR, Denis R, Solon CS, **Roman EA**, Morari J, Moraes JC, Velloso LA. *8º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo*. 2008; 52. Águas de Lindóia – SP.
- 14) Caracterização da função do TNF- α no desenvolvimento da resistência central à insulina. Romanatto T, Picardi PK, Degasperi GR, **Roman EA**, Cintra D, Velloso LA. *II Encontro sobre Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Secreção e Ação da Insulina e no Controle Metabólico: Síndrome Metabólica*. 2007. Poconé – MT.