

MARCIANE MILANSKI

EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS NA INDUÇÃO
DE INFLAMAÇÃO HIPOTALÂMICA

CAMPINAS

2009

MARCIANE MILANSKI

EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS NA INDUÇÃO
DE INFLAMAÇÃO HIPOTALÂMICA

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

ORIENTADOR: PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

CAMPINAS
Unicamp
2009

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

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

M589e Milanski, Marciane
 Efeitos de ácidos graxos na indução de inflamação hipotalâmica /
 Marciane Milanski. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Ácidos graxos. 3. Receptores Toll-like. I.
Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês :Effects of fatty acids on the induction of hypothalamic inflammation

Keywords: • Obesity
 • Fatty acids
 • Toll-like receptors

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero
Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo
Profa. Dra. Márcia Queiroz Latorraca
Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Data da defesa: 27-02-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado


Marciane Milanski

Orientador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

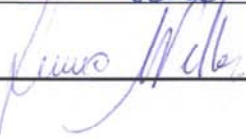
Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Márcia Queiroz Latorraca 

2. Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni 

3. Prof^a. Dr^a. Eliana Pereira De Araújo 

4. Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero 

5. Prof. Dr. Licio Augusto Velloso 

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

Data: 27/02/2009

DEDICATÓRIA

À minha família

A meu avô **Bernardo Milanski** (*in memoriam*)

Pelo amor, incentivo e confiança
em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos amigos...

LOUCOS E SANTOS

Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem aquele brilho questionador e tonalidade inquietante. A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos. Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo. Deles não quero resposta, quero meu avesso. Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim. Para isso, só sendo louco. Quero os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças. Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta. Não quero só o ombro e o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade. Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos. Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice! Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto; e velhos, para que nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou. Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esqueceré de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril.

Oscar Wilde

**Obrigada!
AMO VOCÊS!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço de uma maneira especial ao meu orientador **Licio Augusto Velloso**, a pessoa mais apaixonada por Ciência que conheço. Agradeço-o, sobretudo pelo exemplo cotidiano de generosidade, humildade e inteligência. Mais do que um professor, é um pai e um amigo. Obrigada por ter contribuído para a minha formação, mas principalmente por contribuir para que eu me tornasse uma pessoa melhor. Agradeço-o pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos, pelas prazerosas discussões em Ciência e pela experiência de vida que me proporcionou nesses anos... Agradeço-o principalmente por ter acreditado em mim desde o início. OBRIGADA!

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, por me apoiarem e me amarem incondicionalmente.

Ao **Hamilton**, meu Lindinho, por tornar meus dias mais felizes. Pelo companheirismo nessa fase da minha vida. Obrigada!

À **Maristela** e **Vanessa**, minhas amigas e irmãs. É com vocês que quero estar quando preciso de colo... Vocês são a luz no meu caminho sempre.

Talita, Lilia, Tunico, Marcelo, Malu, Raphaël e Scheila. Loucos e Santos. A grande magia de ter amigos como vocês, é poder ser você mesma sempre e não precisar fingir... Eu os agradeço muito por isso!

A **Andressa** e **Ana Paula**, pelo dia-a-dia no laboratório e na vida pessoal. Muitas vezes minhas confidentes. Vocês são as melhores companheiras de trabalho que alguém pode ter... Obrigada pelo carinho e pela grande amizade cultivada ao longo das muitas horas trabalhando juntas.

À minha eterna orientadora **Márcia Queiroz Latorraca** e aos professores **Antonio C. Boschero** e **Everardo Magalhães**, meus exemplos desde o início da vida acadêmica. Admiro-os muito!!

Ao **Prof. Mario Saad**, pela infra-estrutura disponibilizada e pelas lições de humildade.

Aos alunos do Laboratório de Sinalização Celular, pela convivência cordial e troca de conhecimentos durante todos esses anos: **Adriana Torsoni, Alessandra Girasol, Andressa Coope, Ana Paula Arruda, Carina Solon, Carla Nunes, Claudio T. de Souza, Daniela Bertelli, Daniela Razdi, Dennys Cintra, Eli Mansour, Eliana P. de Araújo, Erika Anne, Gabriela Albuquerque, Giovanna Degasperri, Íkaro Breder, Joane Morari, Juliana de Moraes, Livia Pascoal, Marcio Torsoni, Maria Esméria do Amaral, Patricia Prada, Raphaël Denis, Raquel Barbuio, Raquel Leal e Talita Romanatto**.

A **Ricardo Contarteze** (in memorian), pelo exemplo de persistência e garra... Deus te levou cedo demais... Tínhamos muito a aprender com você... Você nos faz falta...

À **Erika Anne** por manter nosso laboratório um exemplo de organização e funcionalidade. Ao **Marcio Cruz** pela competência e carinho com que cuida de nossos animais experimentais e ao **Gerson Ferraz** e **Luiz Janeri** pela ajuda no laboratório e pelos momentos de descontração e amizade.

Ao **Carlos Henrique Fregadelli** e **Letícia Souza** pela excelente assessoria na elaboração da aula e agradecimentos. Obrigada!

À **Secretaria de Estado de Saúde** de Mato Grosso pela concessão de licença integral das atividades profissionais, o que proporcionou a dedicação exclusiva ao Curso de Doutorado.

À Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP** pela minha formação nesses anos de doutorado. Ao **CNPq**, **CAPES** e à **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Aos ratinhos do laboratório, que doaram suas vidas à pesquisa!

A todos que contribuíram meu eterno agradecimento. Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou tv.

Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor.

Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto.

Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver".

Amyr Klink

RESUMO

O consumo de dietas ricas em gordura é o mais importante fator ambiental que contribui para o aumento da prevalência de obesidade na sociedade moderna. Em modelos animais com obesidade, induzida por dieta, a ativação da resposta inflamatória no hipotálamo produz resistência molecular e funcional aos hormônios anorexigênicos insulina e leptina, o que resulta em defeitos no controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Para explorar a hipótese de que ácidos graxos podem desencadear resposta inflamatória e aumentar a expressão de citocinas no hipotálamo por induzir a ativação de TLR2/4 e/ou estresse de RE, ratos foram canulados e submetidos ao tratamento, por via intracerebroventricular (icv), com ácido graxo saturado e em seguida o extrato de proteínas hipotalâmicas foi obtido para determinação da expressão de proteínas por *imunoblot*. A localização de marcadores inflamatórios foi obtida por imunohistoquímica. Observou-se que ácidos graxos saturados de cadeia longa ativam predominantemente TLR4, o que determina não só a indução da expressão local de citocinas, mas também promove estresse de RE. Ratos alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos monoinsaturados não desenvolveram resistência hipotalâmica à leptina, enquanto que a mutação com perda da função do TLR4 e a inibição imunofarmacológica do TLR4 protegeu os camundongos da obesidade induzida por dieta. O TLR4 age como um alvo molecular predominante para ácidos graxos saturados no hipotálamo, o que desencadeia resposta inflamatória e resistência a sinais anorexigênicos. Assim, conclui-se que ácidos graxos saturados ativam as vias de TLR2/TLR4 e estresse de RE em hipotálamo sendo a ativação mais significativa para TLR4, o que, por sua vez, determina a indução de estresse de RE. O TLR4 é um importante mediador da disfunção hipotalâmica durante o desenvolvimento da

obesidade, como esse é um fenômeno importante durante a instalação da
obesidade, esse receptor é um alvo terapêutico atrativo para tal condição
epidêmica.

ABSTRACT

In animal models of diet-induced obesity, the activation of an inflammatory response in the hypothalamus produces molecular and functional resistance to the anorexigenic hormones insulin and leptin. The primary events triggered by dietary fats that ultimately lead to hypothalamic cytokine expression and inflammatory signaling are unknown. Here, we test the hypothesis that dietary fats act through the activation of Toll-like receptors 2/4 and endoplasmic reticulum stress to induce cytokine expression in the hypothalamus of rodents. Rats were treated icv with different types of fatty acids and hypothalamic protein extracts were obtained for determination of inflammatory and endoplasmic reticulum stress protein expression by immunoblot. Localization of inflammatory markers were performed by immunohistochemistry. Long-chain saturated fatty acids activate predominantly Toll-like receptor 4 signaling, which determines not only the induction of local cytokine expression but also promotes endoplasmic reticulum stress. Rats fed on a monounsaturated fat-rich diet do not develop hypothalamic leptin resistance, while Toll-like receptor 4 loss-of-function mutation and immunopharmacological inhibition of Toll-like receptor 4 protects mice from diet induced obesity. Toll-like receptor 4 acts as a predominant molecular target for saturated fatty acids in the hypothalamus, triggering the intracellular signaling network that induces an inflammatory response and determines the resistance to anorexigenic signals.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	Hormônio estimulador α -melanocítico
293T	Linhagem celular epitelial embrionária humana do rim
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
AHA	<i>American Heart Association</i>
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análises de variâncias
ATF-6	<i>Activating transcription factor 6</i>
BSA	Albumina de soro bovino
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido Palmítico
C18:0	Ácido Esteárico
C18:1	Ácido graxo oléico
C18:2	Ácido graxo linoléico
C18:3	Ácido graxo linolênico
C20:0	Ácido graxo araquídico
C22:0	Ácido graxo behênico
CART	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CCK	Colecistocinina
CREB-H	<i>cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H</i>
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DL	Diluyente
DTT	Ditiotreitol

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eIF2- α	<i>Eukaryotic initiation factor 2 alpha</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ENDEF	Estudo Nacional da Despesa Familiar
ER ou ER	Retículo endoplasmático
ERAD	<i>Endoplasmatic reticulum associated protein degradation</i>
ET	Extrato Total
F4/80	Glicoproteína de superfície celular de macrófagos ativados
FBS	Soro Fetal Bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPD	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GIP	Peptídio inibitório gástrico
GLP-1	Peptídio similar ao glucagon
GRP78	<i>Glucose-Regulated Protein 78-KD</i>
HAO	Dieta hiperlipídica rica em ácido oléico
HPB	<i>2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	Dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados
I κ B	Quinase inibidora do fator nuclear κ B
ICV	Intracerebroventricular
IKK	I κ B quinase
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-6	Interleucina-6

IMC	Índice de massa corpórea
INFs	Interferons
IR	Receptor de insulina
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor associated kinase</i>
IRE-1	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IRSs	Substratos do receptor de insulina
JNK	<i>c-jun amino-terminal kinase</i>
LH	Hipotálamo lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
ObRb	Receptor de leptina
PBA	<i>4-Phenylbutyric acid</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
p-eIF2- α	<i>Eukaryotic initiation factor 2 alpha phosphorylated</i>
PERK	<i>PKR-like endoplasmatic-reticulum kinase</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
p-JNK	<i>c-jun amino-terminal kinase phosphorylated</i>
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfona
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição

POMC	Pro-opiomelanocortina
p-PERK	<i>PKR-like endoplasmatic-reticulum kinase phosphorylated</i>
PPV	Pesquisa sobre Padrões de Vida
PTP-1B	<i>Protein tyrosine phosphatase 1 B</i>
PVN	Núcleo paraventricular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	<i>Rowell Park Memorial Institute (RPMI)-1640</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
SM	Mistura de saturados
SOCS3	Supressor de sinalização de citocina 3
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TICAM	<i>TRIF/TIR-domain-containing molecule 1</i>
TIR	<i>Toll/IL-1R homology</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral - alfa
TRAF2	<i>TNF-receptor-associated factor 2</i>
TRAF6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
TRAM	Molécula adaptadora relacionada à TRIF
TRH	Hormônio liberador de tirotrofina
TRIF	Proteína adaptadora que contém domínio TIR
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
U/I	Unidade internacional

UPR	<i>Unfolded protein response</i>
USDA	<i>United State Department of Agriculture</i>
VET	Valor energético total
VM	Mistura de vegetais
WHO	<i>World Health Organization</i>
XBP-1	<i>X- box binding protein</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
FIGURA 1	30
TABELA 1	56

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	35
CAPÍTULO 1	37
Artigo: Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: Implications for the pathogenesis of obesity – <i>J. Neuroscience 2009</i>	
CONCLUSÃO GERAL	50
APÊNDICE	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que traz prejuízos à saúde do indivíduo. Por ser um importante fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis como, por exemplo, resistência à insulina e diabetes tipo 2, problemas cardiovasculares, aterosclerose, doenças hepáticas e alguns tipos de câncer, esta enfermidade tem forte influência no perfil de morbi-mortalidade da população.

Nas últimas quatro décadas o aumento da prevalência da obesidade em várias regiões do planeta se revela como um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. Mais de 300 milhões de pessoas no mundo são consideradas obesas ($\text{IMC} \geq 30$) (1). Nos Estados Unidos quase um terço dos adultos são obesos, e em muitos países europeus tem sido observada uma tendência similar, apesar do aumento da prevalência não atingir os mesmos níveis dos americanos (2).

A obesidade hoje não se resume mais a um problema presente apenas nos países ricos, acometendo cada vez maiores parcelas dos estratos populacionais menos favorecidos. No Brasil, os dados a respeito de sobrepeso/obesidade demonstra crescimento da sua prevalência entre as décadas de 70 e 90. As análises comparativas entre os inquéritos antropométricos nacionais ENDEF - Estudo Nacional da Despesa Familiar (3) e PNSN - Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (4), e regionais PPV - Pesquisa sobre Padrões de Vida (5) permitiram identificar a amplitude e gravidade do problema. A tendência encontrada para o sobrepeso ($\text{IMC} > 25$) nos adultos foi a de aumento na prevalência entre os três estudos, que chega a

ser o dobro em 1997 em relação a 1975, com exceção das mulheres na região Sudeste.

O aumento da prevalência dessa doença tem feito com que vários países adotem medidas ou implantem programas cujo objetivo principal é de promover a prevenção e o tratamento da obesidade. As projeções feitas em 2000 pela Organização Mundial da Saúde não são nada animadoras. Se nada for feito, para impedir o aumento do número de pessoas que se tornam obesas a cada ano, em 2025 cerca de 50 % dos norte-americanos e 25 % dos brasileiros serão obesos (6).

A obesidade ocorre quando há desequilíbrio entre ingestão calórica e gasto energético, prevalecendo o primeiro sobre o segundo. Isto resulta num quadro de balanço energético positivo e, conseqüentemente, aumento da prevalência dessa doença (7,8). As causas para esse desequilíbrio se devem à interação entre diversos fatores genéticos, metabólicos, hormonais e ambientais, ainda não totalmente esclarecidos.

Na última década observou-se um avanço surpreendente do conhecimento científico a respeito dos fenômenos que participam do controle neural da fome e da termogênese (7,8). Tais avanços permitiram o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da obesidade, e deverão contribuir para que se desenvolvam métodos terapêuticos mais efetivos.

O controle deste complexo sistema que regula o fluxo de energia é feito pelo hipotálamo, uma região pequena (cerca de 1/300 do peso total do

cérebro), responsável pela recepção e integração de informações sobre o status energético corporal. O hipotálamo, também constituído por substância cinzenta, é o principal centro integrador das atividades dos órgãos viscerais, sendo um dos principais responsáveis pela homeostase corporal. Ele faz ligação entre o sistema nervoso e o sistema endócrino, atuando na ativação de diversas glândulas endócrinas.

Essas informações chegam ao hipotálamo através de alguns sinalizadores, por exemplo, os nutrientes, os hormônios secretados pelo trato gastrointestinal (CCK, GLP-1, GIP e grelina), a insulina e a leptina. Dentre estes, os mais importantes são a insulina e principalmente a leptina (9). A insulina é um hormônio peptídico secretado exclusivamente pelas células β pancreáticas principalmente em resposta a concentrações plasmática de nutrientes. Já a leptina é um hormônio com características estruturais de citocina produzido predominantemente pelo tecido adiposo branco em relação diretamente proporcional à massa adiposa.

O principal sítio de ação da leptina e da insulina no sistema nervoso central são os neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (7,8). Para alcançar tais neurônios a leptina e a insulina atravessam a barreira hemato-encefálica que utiliza um sistema saturável de transporte mediado por receptores específicos, presentes tanto no plexo coróide como em capilares cerebrais (9).

Até o presente momento, duas subpopulações neuronais foram caracterizadas no núcleo arqueado. Uma delas expressa os neurotransmissores orexigênicos NPY e AgRP e outra os neurotransmissores

anorexigênicos α -MSH (clivado a partir de POMC) e CART. Além de expressarem receptores para leptina (ObRb - forma mais predominante nesta região anatômica), tais grupos de neurônios expressam também receptores para insulina (IR), hormônio este que desempenha um papel fundamental na modulação da ação da leptina (9).

Tanto a leptina quanto a insulina, agindo de forma combinada, têm a capacidade de inibir neurônios produtores de NPY/AgRP e ativar neurônios produtores de POMC/CART (9,10,11). Neurônios NPY/AgRPérgicos encontram-se ativados nos períodos de jejum ou quando a massa total de tecido adiposo está reduzida. Nestas circunstâncias, conexões axonais entre neurônios do núcleo arqueado e neurônios dos núcleos paraventricular e hipotalâmico lateral levam à inibição da produção de neurotransmissores anorexigênicos e ativadores da termogênese (TRH e CRH) no núcleo paraventricular, e ativação da produção de neurotransmissores orexigênicos e inibidores da termogênese (orexina e MCH) no núcleo hipotalâmico lateral. O resultado desta regulação é o aumento da fome e redução da termogênese.

Por outro lado, em períodos pós-prandiais, ou quando estoques de energia no tecido adiposo são satisfatórios, há aumento dos níveis sanguíneos de insulina e leptina, o que leva à inibição dos neurônios orexigênicos e ao estímulo dos neurônios anorexigênicos. O resultado é a inibição de neurônios do núcleo hipotalâmico lateral, produtores de orexina e MCH e estímulo de neurônios do núcleo paraventricular, produtores de CRH e TRH. Ocorrerá então saciedade acompanhada de aumento da termogênese (8,9).

Há diversas evidências de um *cross-talk* entre as vias de sinalização da insulina e da leptina, não apenas no hipotálamo, mas também em tecidos periféricos (10,12). A comum associação epidemiológica entre obesidade e diabetes *mellitus* logo despertaram o interesse a respeito de possíveis mecanismos de resistência hipotalâmica à sinalização da insulina e da leptina como participantes da gênese da obesidade, de forma similar ao já conhecido fenômeno da resistência periférica à insulina participando da gênese do diabetes *mellitus* tipo 2 (8).

Há muito se observava que, pacientes ou animais experimentais com diabetes *mellitus*, ao desenvolverem quadros infecciosos ou inflamatórios graves, apresentavam significativo comprometimento da ação da insulina mensurável pela redução do *clearance* de glicose induzido por este hormônio (13). Durante a instalação e a progressão do quadro infeccioso/inflamatório há produção e secreção de uma série de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Tais citocinas cumprem o papel primário de mediar a ativação de elementos do sistema imune participantes da resposta ao agente ou mecanismo agressor. Entretanto, agindo em células musculares, hepáticas e no tecido adiposo, tais citocinas ativam vias pró-inflamatórias que culminam com a modulação negativa da via de sinalização da insulina, a qual encontra em células destes tecidos, seus principais alvos metabólicos (14).

Dentro deste contexto de resistência molecular a ação dos hormônios leptina e insulina nos neurônios do sistema nervoso central, vários fatores podem estar envolvidos, como por exemplo: fatores genéticos, idade,

sedentarismo, hábitos alimentares, dietas ricas em lipídios ou carboidratos, estresse e infecções. Dentre tais fatores, o que tem maior relevância epidemiológica é o consumo de dietas hiperlipídicas.

Há muitos anos, pesquisadores têm procurado estabelecer associações entre padrões alimentares e riscos de morbidade e mortalidade. Keys e colaboradores (15) publicaram na década de 50 o primeiro artigo que fornecia recursos quantitativos para a predição das respostas do colesterol sérico a lipídios da dieta. Surgiram então as primeiras recomendações, por parte de cientistas e da *American Heart Association* (AHA), para diminuição da ingestão de gordura, principalmente saturada, para homens com concentração sérica de colesterol alta. A partir daí, dieta hipolipídica tem sido considerada alimentação saudável nos Estados Unidos e praticamente em todo o mundo (16).

Nos Estados Unidos, inúmeras políticas públicas têm como objetivo incentivar a redução do consumo de lipídios, na tentativa de deter o avanço da epidemia de obesidade. O USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) recomenda, por meio da pirâmide alimentar (17), que gorduras e óleos sejam usados com moderação e sua proporção na dieta não deve ultrapassar 30 % do valor energético total (VET). Já o mais recente *Dietary Guidelines for Americans* (guia alimentar para americanos) recomenda que o consumo de lipídios esteja entre 20 e 35 % do VET, principalmente na forma de óleos vegetais, nozes e peixes (18). O guia alimentar para a população brasileira recomenda que o consumo de lipídios esteja entre 15 e 30 % do VET (19), recomendação semelhante à da Organização Mundial da Saúde (20). A AHA (21) recomenda para a população em geral a diminuição da gordura saturada

da dieta para menos do que 10 % do VET da dieta. Alguns autores como Ornish (22), vão além e defendem que benefícios máximos para a saúde seriam atingidos com dietas contendo somente 10 % de energia na forma de lipídios totais.

A superalimentação facilitada por um aumento considerável na produção, industrialização e distribuição de alimentos hipercalóricos, principalmente ricos em ácidos graxos saturados, exerce um impacto importante na regulação do apetite pelo hipotálamo. De acordo com um estudo realizado pelo nosso grupo, animais experimentais tratados com dieta contendo aproximadamente 40 % de gordura saturada por 16 semanas apresentam um aumento da expressão de proteínas de resposta inflamatória no hipotálamo, entre elas: $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 . Na presença de níveis elevados destas citocinas, neurônios do hipotálamo apresentam ativação de vias intracelulares envolvidas com a resposta a sinais inflamatórios. Proteínas com atividade serina quinase presentes nessas vias catalisam a fosforilação em serina de importantes participantes da via de sinalização da insulina o que leva a uma resistência molecular à ação desse hormônio no hipotálamo de animais alimentados com dieta hiperlipídica (23).

Pelo menos quatro mecanismos distintos estão envolvidos nas vias de sinalização que levam à produção de citocinas e resistência hipotalâmica aos hormônios adipostáticos insulina e leptina em resposta a dieta hiperlipídica no hipotálamo: JNK, IKK, SOCS3 e PTP1B (24).

Tanto $\text{TNF}\alpha$, como dietas hiperlipídicas podem induzir a ativação da serina/treonina quinase JNK no hipotálamo. A ativação da JNK leva à

fosforilação em serina dos substratos tradicionais do receptor de insulina (IRSs), responsáveis pela ativação da PI3K/Akt, o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via. A outra via pró-inflamatória que pode ser ativada tanto pelo TNF- α quanto pela IL-1 β é a IKK/I κ B/NF κ B. A ativação de IKK promove a dissociação do complexo I κ B/NF κ B, levando a ativação do NF κ B e sua translocação para o núcleo, mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs, o que compromete a transdução do sinal da insulina através desta cascata (23).

O aumento da expressão da SOCS3 e da tirosina fosfatase PTP1B no hipotálamo em resposta à dieta hiperlipídica também compromete a sinalização da leptina e da insulina. A SOCS3 atua através de dois mecanismos: primeiro pela interação física com o receptor de leptina ObRb e STAT3 (25) e segundo pela ubiquitinação e degradação dos substratos do receptor de insulina (26). A enzima PTP1B atua catalisando e desfosforilando tanto o receptor de insulina, como os substratos desse receptor, desligando o sinal gerado pela insulina (27).

Estudos recentes têm fornecido fortes evidências da ativação de *Toll-like receptor 2* e 4 (TLR2/4) e indução de estresse de RE como mecanismos distintos envolvidos no desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 em resposta ao consumo de dietas ricas em lipídios e obesidade em tecidos periféricos (Figura 1).

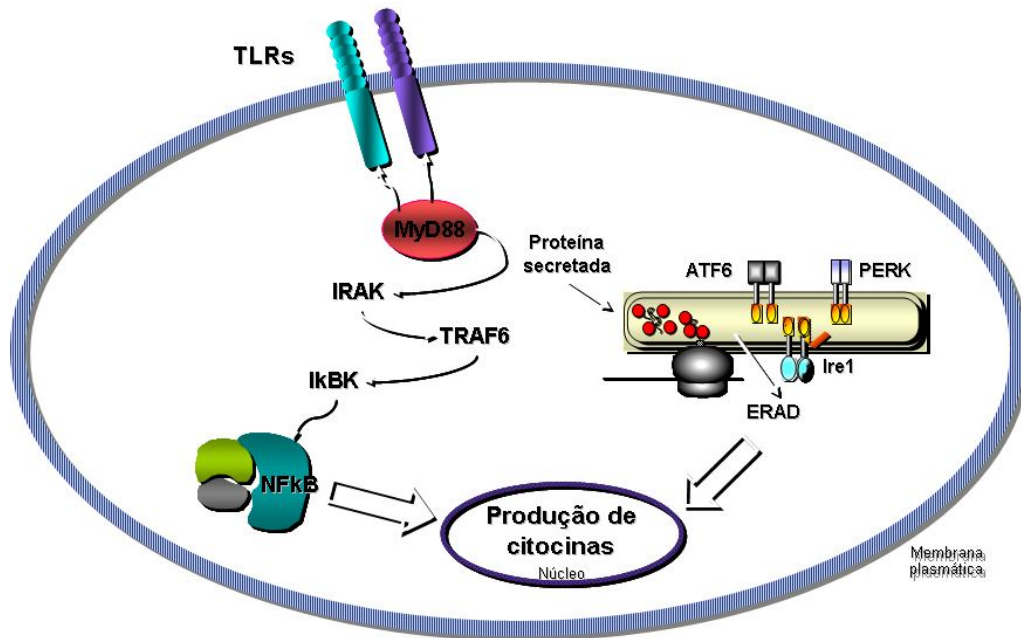


Figura 1: Vias de sinalização do *toll-like receptor* e estresse de retículo endoplasmático, mecanismos conhecidos por serem ativados por ácidos graxos saturados. Tanto a ativação de TLR2 e TLR4 quanto a indução de estresse de retículo endoplasmático levam à produção de citocinas pró inflamatórias. A ativação de resposta inflamatória em células adiposas, hepáticas e musculares tem papel importante no desenvolvimento de resistência à insulina nesses tecidos.

TLRs são membros bem conservados da superfamília de receptores de interleucina-1 (IL-1R), que respondem a partículas potencialmente patogênicas (ex: vírus, bactérias, RNA dupla fita), levando à ativação da resposta imune inata (28,29). Além disso, eles podem reconhecer ligantes endógenos liberados pela célula em resposta ao estresse.

Até o momento, doze membros da família TLR foram identificados (30). TLR 1, 2, 4 e 6 são capazes de reconhecer componentes lipídicos. Dímeros de TLR1/2 reconhecem diacil-lipopeptídeos, dímeros de TLR2/6 reconhecem

triacil-lipopeptídeos e TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS) presentes também em gorduras saturadas. A ativação da sinalização por meio de TLRs leva a indução da expressão de genes relacionados com a resposta imune e com a produção de citocinas (28,29,31,32).

A associação dos TLRs com seus ligantes ativa duas vias de sinalização distintas, a via dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a via independente de MyD88 (33). Após sua ativação, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de moléculas adaptadoras que contêm um domínio TIR que reconhece o domínio TIR do TLR. Há quatro moléculas adaptadoras que exercem esta função: o MyD88, TRIF, TICAM e TRAM (34,35). O MyD88 e o TRIF, são responsáveis pela ativação de diferentes vias de sinalização, que acarretam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (INFs), respectivamente.

Mais recentemente, pesquisadores mostraram que *Toll-like receptor 2* e 4 atuam como fatores determinantes na íntima associação clínica existente entre o consumo de dietas ricas em gorduras e obesidade com resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (36,37,38,39). Esses receptores, ativados por ácidos graxos, modulam eventos inflamatórios e resistência à insulina em tecidos periféricos.

O TLR4 é expresso em muitos tipos celulares incluindo macrófagos, adipócitos, hepatócitos, células musculares esqueléticas e micróglia. Há aumento da expressão desse receptor, em adipócitos de roedores geneticamente obesos (ob/ob e db/db) e de camundongos com obesidade induzida por dieta (37). Estudos recentes mostram que, adipócitos de

indivíduos obesos produzem citocinas e induzem um estado de inflamação crônica o que, pelo menos em parte, é devido à infiltração de macrófagos no tecido adiposo (40).

É sabido que ácidos graxos, particularmente os saturados (C14:0, C16:0 e C18:0) ativam o IKK/NF κ B e estimulam a produção de TNF α e IL-6 em macrófagos via TLR4. As células 293T transfectadas com o dominante negativo de MyD88 ou macrófagos isolados do peritônio de camundongos mutantes para TLR4 perderam a capacidade de indução da produção de citocinas em resposta ao tratamento com ácidos graxos. A deficiência de TLR4 também atenua a fosforilação em serina do IRS-1 induzida por lipídios e normaliza a fosforilação em tirosina estimulada pela insulina em adipócitos (37).

Esses estudos substanciam a hipótese de que TLR4 atua como mediador da ativação de inflamação e resistência à insulina induzida por lipídios. O aumento plasmático de ácidos graxos, encontrados em indivíduos obesos, leva a ativação da sinalização do TLR4 em vários tipos celulares, o que leva a produção de citocinas e conseqüentemente a ativação de IKK, JNK, PKC e SOCS3, todos conhecidos por fosforilar os IRSs em serina, que interfere na sinalização e ação da insulina.

O retículo endoplasmático (RE) desempenha função central na biossíntese de lipídios e proteínas. Sua membrana é o sítio de produção de todas as proteínas transmembrana e lipídios, para a maioria das organelas da célula. Todas as proteínas destinadas à secreção e todas as proteínas destinadas ao próprio RE, além do aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos

e membrana plasmática são primeiramente importadas para o RE a partir do citosol. No lúmen do RE, as proteínas assumem sua conformação e se oligomerizam, pontes dissulfeto são formadas e oligossacarídeos N-ligados são adicionados. A membrana do RE também oferece uma contribuição importante para as membranas das mitocôndrias e dos peroxissomos, pois produz a maioria de seus constituintes lipídicos (41).

Em condição de estresse patológico, a homeostase do RE é rompida, levando ao acúmulo de proteínas mal formadas no seu lúmen. Nesta situação, as células acometidas ativam um complexo sistema de sinalização conhecido como *Unfolded Protein Response* (UPR). Os eventos subsequentes à ativação deste complexo mecanismo de sinalização celular denominam-se estresse de retículo endoplasmático e tem como objetivo final a preservação da integridade da célula afetada.

Privação ou excesso de glicose ou nutrientes, infecção viral, hipóxia, toxinas, presença de lipídios, aumento na síntese de proteínas secretoras e expressão de proteínas mutantes ou mal formadas são algumas das situações que podem desencadear esse processo (42,43,44,45). Várias dessas condições ocorrem na obesidade. Além disso, na obesidade, ocorrem também: aumento da demanda da maquinaria sintética das células em vários sistemas secretórios, estresse mecânico por acúmulo excessivo de lipídios, anormalidades no fluxo energético intracelular e disponibilidade de nutrientes.

Recentes estudos com modelos experimentais indicam que estresse de RE inicia e integra vias inflamatórias e vias de sinalização de insulina com

obesidade e desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (38,39).

As principais proteínas responsivas ao estresse de RE são: IRE-1 (*inositol-requiring enzyme-1*), PERK (*PKR-like endoplasmic-reticulum kinase*) e ATF-6 (*activating transcription factor 6*). As duas principais vias inflamatórias que interferem na ação da insulina, JNK e IKK, são ativadas em resposta a IRE-1 e PERK durante a resposta ao estresse de RE.

A ativação de JNK pela IRE-1 envolve TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) (41,46). O IKK/NF κ B pode ser ativado tanto por IRE-1, que interage com IKK através do TRAF2, quanto pela ativação da PERK, que leva à degradação do I κ B, facilitando a atividade do NF κ B. Além disso, a indução de estresse de RE leva à ativação de CREB-H, um importante mediador inflamatório no fígado, e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente, estresse oxidativo celular. O estresse oxidativo, característico na obesidade, é considerado um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de resistência à insulina em obesos (41,47,48).

No presente estudo avaliamos a participação da sinalização através de TLRs e a indução de estresse de retículo endoplasmático em hipotálamo de ratos tratados, por via intracerebroventricular, com ácidos graxos e/ou mantidos com dieta hiperlipídica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Gerais:

Avaliar a participação das vias de sinalização TLR2/4 e Estresse de Retículo Endoplasmático na inflamação hipotalâmica induzida por ácidos graxos em roedores.

Específicos:

- Avaliar o efeito de diversos tipos de composição de ácidos graxos, comumente consumidos na dieta humana, sobre a expressão de citocinas em hipotálamo de ratos
- Avaliar o efeito isolado de diversos tipos de ácidos graxos saturados sobre a expressão de citocinas em hipotálamo de ratos
- Avaliar o efeito de ácidos graxos saturados nas vias de estresse de retículo endoplasmático e TLR 2/4 no hipotálamo de ratos
- Determinar a predominância e/ou dependência das vias TLR4 e estresse de RE em resposta a ácidos graxos saturados
- Avaliar a sensibilidade à leptina e a variação de peso de roedores em resposta à dietas hiperlipídicas ricas em ácidos graxos saturados e monoinsaturados
- Verificar o papel do TLR4 como mediador da disfunção hipotalâmica durante o desenvolvimento da obesidade.

CAPITULO 1

Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity

Marciane Milanski,¹ Giovanna Degasperi,¹ Andressa Coope,¹ Joseane Morari,¹ Raphael Denis,¹ Dennys E. Cintra,¹ Daniela M. L. Tsukumo,¹ Gabriel Anhe,³ Maria E. Amaral,¹ Hilton K. Takahashi,³ Rui Curi,³ Helena C. Oliveira,² José B. C. Carvalheira,¹ Silvana Bordin,³ Mário J. Saad,¹ and Lício A. Velloso¹

Departments of ¹Internal Medicine and ²Physiology and Biophysics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil, and ³Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, 05508-900 São Paulo, Brazil

In animal models of diet-induced obesity, the activation of an inflammatory response in the hypothalamus produces molecular and functional resistance to the anorexigenic hormones insulin and leptin. The primary events triggered by dietary fats that ultimately lead to hypothalamic cytokine expression and inflammatory signaling are unknown. Here, we test the hypothesis that dietary fats act through the activation of toll-like receptors 2/4 and endoplasmic reticulum stress to induce cytokine expression in the hypothalamus of rodents. According to our results, long-chain saturated fatty acids activate predominantly toll-like receptor 4 signaling, which determines not only the induction of local cytokine expression but also promotes endoplasmic reticulum stress. Rats fed on a monounsaturated fat-rich diet do not develop hypothalamic leptin resistance, whereas toll-like receptor 4 loss-of-function mutation and immunopharmacological inhibition of toll-like receptor 4 protects mice from diet-induced obesity. Thus, toll-like receptor 4 acts as a predominant molecular target for saturated fatty acids in the hypothalamus, triggering the intracellular signaling network that induces an inflammatory response, and determines the resistance to anorexigenic signals.

Key words: obesity; inflammation; hypothalamus; cytokine; nutrition; feeding

Introduction

The consumption of fat-rich diets is among the most important environmental factors predisposing to obesity in modern societies (Stein and Colditz, 2004; Freire et al., 2005; Moreno and Rodríguez, 2007). In animal models of genetic and diet-induced obesity, the activation of an inflammatory response in the hypothalamus leads to the molecular and functional resistance to the adipostatic hormones, leptin and insulin, resulting in a defective control of food intake and energy expenditure (Carvalheira et al., 2003; Howard et al., 2004; De Souza et al., 2005). Reversal of these effects can be achieved by distinct genetic and pharmacological approaches, aimed at inhibiting inflammatory signaling (Howard et al., 2004; De Souza et al., 2005).

Recent studies have provided strong evidence for the contribution of toll-like receptor (TLR) activation and endoplasmic reticulum stress (ER stress) induction as mechanisms linking the consumption of high-fat diets and obesity to insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (Ozcan et al., 2004, 2006; Shi et al.,

2006; Tsukumo et al., 2007). TLRs are highly conserved members of the interleukin-1 receptor superfamily that respond to microbial signature motifs, leading to the activation of innate immune responses (Akira, 2003; Akira et al., 2006). Four members of the TLR family, TLR1, 2, 4, and 6, are known to recognize lipid-containing motifs; TLR1/2 dimers recognize diacyl lipopeptides, TLR2/6 dimers recognize triacyl lipopeptides and TLR4 recognizes lipopolysaccharides (LPS). The activation of TLR signaling leads to the coordinated induction of cytokine and other immune-related genes expression (Shimazu et al., 1999; Takeuchi et al., 2001; Akira, 2003; Akira et al., 2006).

The ER is the organelle responsible for the synthesis and processing of membrane and secretory proteins (Xu et al., 2005). Under certain harmful conditions, the ER homeostasis is disrupted, leading to the accumulation of misfolded and unfolded proteins in the ER lumen (Schröder and Kaufman, 2005; Xu et al., 2005). To deal with this condition, the affected cells activate a complex signaling system known as the unfolded protein response (UPR), aimed at preserving cell integrity while the harmful condition persists (Schröder and Kaufman, 2005; Xu et al., 2005). One of the outcomes of the activation of UPR is the induction of the expression of cytokines and proteins involved in immune surveillance (Krappmann et al., 2004; Marciniak and Ron, 2006). In addition to classical activation by viruses and bacteria (Watowich et al., 1991; Pahl and Baeuerle, 1995), ER stress can be induced by metabolic and nutritional factors such as high levels

Received June 17, 2008; revised Nov. 3, 2008; accepted Nov. 20, 2008.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. We thank Dr. Nicola Conran for English grammar review and Gerson Ferraz for technical support.

Correspondence should be addressed to Lício A. Velloso, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/290359-12\$15.00/0

of glucose and lipids (Ozcan et al., 2004; Nakatani et al., 2005; Ozawa et al., 2005).

Cytokines, induced either by TLR activation and/or by ER stress, can play a pathogenetic role in the development of insulin resistance in peripheral tissues (Ozcan et al., 2004, 2006; Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007). To explore the hypothesis that fatty acids can trigger an inflammatory response in the hypothalamus by inducing TLR activation and/or ER stress, we determined the molecular and functional outcomes of intracerebroventricular injection of fatty acids in rodents. Our results show that long-chain saturated fatty acids act predominantly through TLR4 and suggest that ER stress is a downstream event in the cascade that ultimately leads to inflammatory activation in the hypothalamus.

Materials and Methods

Antibodies, chemicals, and buffers. Antibodies against TNF- α (s.c.-1347, goat polyclonal and s.c.-8301, rabbit polyclonal), IL-1 β (s.c.-1252, goat polyclonal and s.c.-7884 rabbit polyclonal), IL-6 (s.c.-1266, goat polyclonal and s.c.-7920, rabbit polyclonal), IL-10 (s.c.-1783, goat polyclonal), eIF2 α (s.c.-11386, rabbit polyclonal), RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) (s.c.-13073, rabbit polyclonal), phosphor-[Thr981]-PERK (pPERK, s.c.-32577, rabbit polyclonal), GRP78 (s.c.-13968, rabbit polyclonal), c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) (s.c.-46009, goat polyclonal), phosphor[Thr183/Tyr185] JNK (pJNK, s.c.12882, rabbit polyclonal), F4/80 (s.c.-25830, rabbit polyclonal), proopiomelanocortin (POMC) (s.c.-20148, rabbit polyclonal), agouti-related protein (AgRP) (s.c.-50299, rabbit polyclonal), TLR2 (s.c.-10739, rabbit polyclonal and s.c.-16237, goat polyclonal), TLR4 (s.c.-16240 goat polyclonal and s.c.-13591, rat monoclonal), and MyD88 (s.c.-11356, rabbit polyclonal) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. The anti-phospho[Ser52] eIF2 α (p-eIF2 α , #9721 s, rabbit polyclonal) was purchased from Cell Signaling Technology. All the reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad. HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, collagenase, oleic acid/C18:1 (O-1383-1G), linoleic acid/C18:2 (L-1012), linolenic acid/C18:3 (L-2376), palmitic acid/C16:0 (P-5177), stearic acid/C18:0 (S-5376), arachidic acid/C20:0 (A-3881), behenic acid/C22:0 (B-3271), bovine serum albumin (fraction V), bovine serum albumin fatty acid free (A-6003), 5-phenylbutyric acid, (PBA, #P21005), and HBP (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, #01816LD) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium thiopental was from Lilly, recombinant leptin and highly purified *Escherichia coli* LPS were from Calbiochem (Merck; KGaA). All the chemicals used in the real-time PCR and XBP-1 splicing experiments and 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) used in immunofluorescence staining were purchased from Invitrogen and Applied Biosystems.

Diets and fatty acids. Mice and rats were fed either a standard rodent chow (CD) containing 4.0% (wt/wt) (g%) fat, a high-fat chow (HF) containing 36.0 g% fat from animal source, or an unsaturated fat-rich chow [oleic acid-rich (OL)] containing 36.0 g% fat from olive oil. Fatty acids for intracerebroventricular injection were always diluted in ultrapure water containing HBP detergent (0.1%) and fatty acid free BSA (75 μ M). The volumes injected were always 2.0 μ l/dose. The final concentration of fatty acids was always 225 μ M. In some experiments, rats were intracerebroventricularly treated with oleic acid alone (225 μ M) in parallel with a mixture of fatty acids containing palmitic, stearic, arachidic,

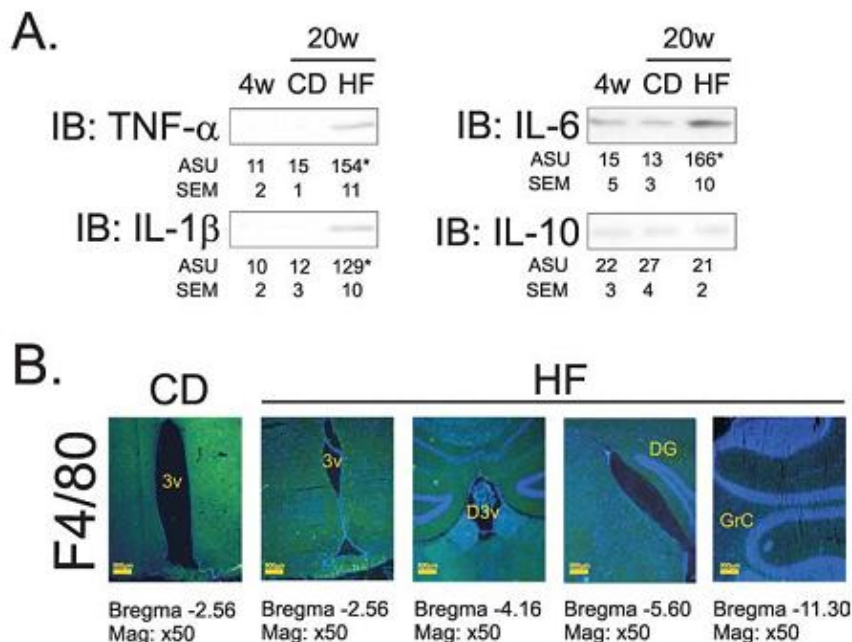


Figure 1. *A*, Immunoblot (IB) analysis of expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 in hypothalamic protein extracts obtained from 4 (4 w)- and 20 (20 w)-week old rats fed on CD and HF diets for 16 weeks, starting at 4 weeks of age. *B*, Immunofluorescence staining of F4/80 in the CNS of rats fed on CD and HF diets for 16 weeks; representative microphotographs were obtained from hypothalamic periventricular (3v) zone, in the first and second panels from the left; dorsal third ventricular (D3v) zone, in the third panel from the left; dentate gyrus zone (DG), in the fourth panel from the left; and granular layer of cerebellum, in the fifth panel from the left. In *A*, n = 5; results are presented as arbitrary scanning units (ASU) \pm SEM, *p < 0.05 versus respective control. *B*, Microphotographs are representative of three distinct experiments; nuclei are stained with DAPI.

and behenic acids (25% each, to a final concentration of 225 μ M), referred to as the saturated mixture (SM); or SM (20%) plus oleic (20%), linoleic (30%), and linolenic (30%) acids (to a final concentration of 225 μ M), referred to as the vegetable mixture (VM). LPS contamination of the fatty acids, HBP and BSA preparations were evaluated by Limulus amoebocyte lysate assay produced by Associates of Cape Cod. LPS in the diets were evaluated by HPLC as described below. Only trace amounts of LPS (ranging from 0.026 to 0.075 EU/nmol) were detected in the reagents. According to a previously study (Weinstein et al., 2008), these levels of LPS do not interfere with the results. Nevertheless, to assure that signal transduction through TLR2 and TLR4 would not be activated by these amounts of LPS, rats were intracerebroventricularly treated with 2.0 μ l solution containing 3.0 or 300 ng LPS (corresponding to the amounts of LPS equivalent to 0.075 and 7.5 EU/nmol, respectively), and signal transduction was determined by immunoblot, as described below and presented in Figure 2*A*.

Animal models and experimental protocols. Male Wistar rats and male TLR4 loss-of-function mutant (C3H/HeJ) mice and their respective controls (C3H/HeN) were used in the experiments. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996). The animals were maintained on a 12 h light/dark cycle and housed in individual cages. For intracerebroventricular cannulation, 8-week-old rats with a body mass of 250–300 g or mice with a body mass of 25–30 g were used. For evaluation of the effects of distinct diets on metabolic and inflammatory parameters, rats were fed from the 4th to 20th weeks of life on CD or HF diets (experiments presented in Fig. 1) or on CD, HF, or OL diets from the 6th to 14th weeks of life (experiments presented in Figs. 8, 9). C3H/HeJ and C3H/HeN mice were fed on HF diet from the 8th to 16th weeks of life (experiments presented in Fig. 8). Pharmacological inhibition of TLR2 and TLR4 was achieved by a daily intraperitoneal injection of 100 μ l solution containing 1.0 μ g IgG of anti-TLR2 or anti-TLR4 antibodies (see Fig. 8), or by a daily intracerebroventricular injection of 2.0 μ l solution containing 0.4

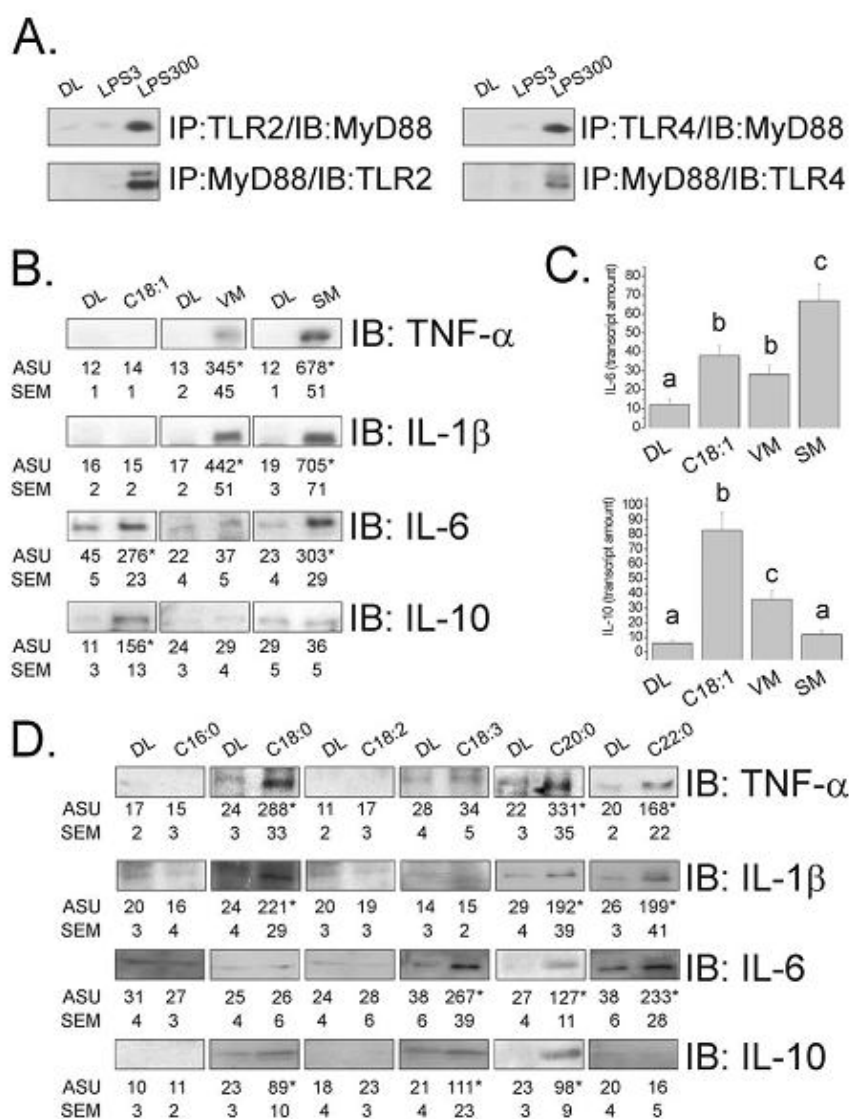


Figure 2. *A*, Immunoprecipitation/immunoblot (IP/IB) analysis of the associations of TLR2 and TLR4 with MyD88 in hypothalamic protein extracts obtained from rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL), 3.0 ng LPS (LPS3), or 300 ng LPS (LPS300) for 3 d. *B*, Immunoblot (IB) analysis of expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 in hypothalamic protein extracts obtained from rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL), oleic acid (C18:1), VM (as presented in Materials and Methods), or SM (as presented in Materials and Methods). *C*, Real-time PCR determination of IL-6 and IL-10 mRNA expression in hypothalamic samples obtained from rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL), oleic acid (C18:1), VM or SM. *D*, Immunoblot analysis of expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 in hypothalamic protein extracts obtained from rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3), arachidic acid (C20:0), and behenic acid (C22:0). In all experiments, $n = 5$; in *B* and *D*, results are presented as arbitrary scanning units (ASU) \pm SEM, * $p < 0.05$ versus respective control; in *C*, results are presented as transcript amount, and different letters refer to significant differences between groups, $p < 0.05$.

μ g IgG of anti-TLR2 or anti-TLR4 antibodies (see Figs. 4, 6, 9). Pharmacological inhibition of endoplasmic reticulum stress was achieved by a daily intraperitoneal injection of 1.0 g/kg PBA (see Fig. 8) or by a daily intracerebroventricular injection of 1.0 mg PBA (see Figs. 5, 6).

Primary culture of macrophages and flow cytometry. Eight-week-old C3H/HeJ and C3H/HeN mice, fed on control diet, were injected intraperitoneally with a single dose of 2% (w/v) sodium thioglycolate (Sigma-Aldrich), and after 2 d, the animals received a lethal dose of anesthetics (sodium thiopental 20 mg/kg) followed by 2.0 ml PBS into the peritoneal cavity to recover the macrophages. Primary cultures were obtained by plating the macrophages at an initial density of 10^5 cells/ml Roswell Park Memorial Institute 1640, in 1.5 cm culture dishes. After 30 min, the

macrophages were treated, for 16 h, with one of the following conditions: 22.5 mM arachidic acid; 22.5 mM arachidic acid plus 5.0 mM PBA or diluent. At the end of the incubation period, the macrophages were harvested and resuspended in PBS containing 10% fatty acid free BSA. For F4/80 labeling, the cells were not submitted to any fixation and permeabilization protocol. For the remainder of the proteins (p-JNK, p-PERK, p-eIF2 α , and GRP78), cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin. Primary antibodies were used in a final concentration of 2.5 μ g/ml and the secondary, FITC conjugated, antibody was used in a final dilution of 1:100. Signal detection was performed in a FACSCalibur flow cytometer equipped with an argon laser, and analysis of data were performed with the CellQuest software (BD Biosciences). Differences are presented as percent variation of control.

HPLC. Determination of lipids and LPS in diets was performed using a method described previously (Martins et al., 2004). Briefly, fatty acids were derivatized with 4-bromomethyl-7-coumarin and the analysis performed in a Shimadzu model LC-10A liquid chromatograph. The samples were eluted using a C8 column (25 cm \times 4.6 id, 5 μ m of particles), with a C8 precolumn (2.5 cm \times 4.6 id, 5 μ m of particles), 1.0 ml/min of acetonitrile/water (77%/23%, v/v) flow and fluorescence detector (325 nm excitation and 395 nm emission). For quantification of fatty acids, the capacity factor, elution sequence, linearity, recovery, precision, interference, and limit of detection were determined. The lower limit of detection was 1.0 pg. Highly purified LPS was used as a tracer.

Hypothalamus histology. Hydrated, 5.0 μ m sections of paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded CNS specimens were obtained from rats treated for 8 or 16 weeks with CD or HF diets. The expression of F4/80 and the coimmunolocalization of TLR4 with F4/80, AgRP, and POMC were evaluated by indirect immunofluorescence staining, as described previously (Bertelli et al., 2006). The expression of F4/80 was evaluated in hypothalamus, frontal, parietal, occipital and cerebellar cortexes, thalamus and hippocampus. The coimmunolocalizations were determined in the hypothalamus.

Reverse-transcription PCR and XBP-1 splicing. Standard reverse-transcription PCR was performed using total RNA from hypothalamic samples as described previously (Bertelli et al., 2006). The primers used for the amplification of XBP-1 (GenBank accession number, AF443192) were as follows: forward, 5'-AAA CAG AGT AGC AGC GCA GAC TGC-3'; reverse, 5'-GGA TCT CTA AAA CTA GAG GCT TGG TG-3'. Products were digested with *Pst*I, and the products were separated on agarose gels and visualized by Cyber Gold staining.

Real-time PCR. IL-6, IL-10, TNF- α , and IL-1 β mRNAs were measured in the hypothalamus of rats treated with CD or HF diets and in intracerebroventricular cannulated rats treated with arachidic acid in the presence or absence of the TLR2 or TLR4 receptor-inhibiting antibodies. Alternatively, these procedures were performed in the presence or absence of the ER stress inhibitor, PBA. In some experiments, C3H/HeJ and C3H/HeN mice were intracerebroventricularly cannulated and treated with arachidic acid or diluent for 3 d. Intron-skipping primers were obtained

from Applied Biosystems: TNF- α , Rn00562055_m1; IL-1 β , Rn00580432_m1; IL-6, Rn00561420; IL-10, Rn00563409 for rats; or, TNF- α , Mm00443258_m1; IL-1 β , Mm00434228_m1; IL-6, Mm99999064; IL-10, Mm00439615 for mice. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primers (Applied Biosystems) were used as control: #4352338E for rats, and #4352339E for mice. Real-time PCR analysis of gene expression was performed in an ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through five-point, twofold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 3.0 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nM of each specific primer, SYBR SAFE PCR master mix, and RNase free water to a 20 μ l final volume. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

Immunoprecipitation and immunoblotting. For evaluation of cytokine expression, TLR activation and ER stress induction, the hypothalamus of anesthetized rats were excised and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C. Aliquots of the resulting protein extract containing 2.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against TLR2, TLR4, and MyD88 at 4°C overnight, followed by SDS-PAGE transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-TLR2, anti-TLR4, or anti-MyD88 antibodies. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10, anti-pJNK, anti-JNK, anti-pPERK, anti-PERK, anti-GRP78, and anti-pelF2 α . Specific bands were detected by chemiluminescence, and visualization was performed by exposure of the membranes to RX-films.

Statistical analysis. Specific protein bands present in the blots and cDNA bands in agarose gels were quantified by digital densitometry (ScionCorp). Mean values \pm SEM obtained from densitometry scans and from real-time PCR, XBP-1 splicing measurements, body mass determination, and food intake were compared using Tukey–Kramer test (ANOVA) or Student's *t* test, as appropriate; *p* < 0.05 was accepted as statistically significant.

Results

High-fat diet induces inflammatory protein expression in hypothalamus

In the first part of the study, Wistar rats were treated either with a CD containing 4.0 g% total fat (2.0 g% saturated fat, as determined by HPLC), or an HF, containing 36.0 g% total fat (5.0 g% saturated fat, as determined by HPLC). Consumption of the HF diet for 16 weeks led to a significant increase in the expression of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, but not of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, in the hypothalamus (Fig. 1A). These effects were accompanied by an increased expression of the F4/80 antigen in cells present mostly in the medial eminence and arcuate nucleus of the hypothalamus, but not in all other anatomical sites of the brain examined (frontal, parietal, occipital and cerebellar cortices, thalamus and hippocampus) (Fig. 1B).

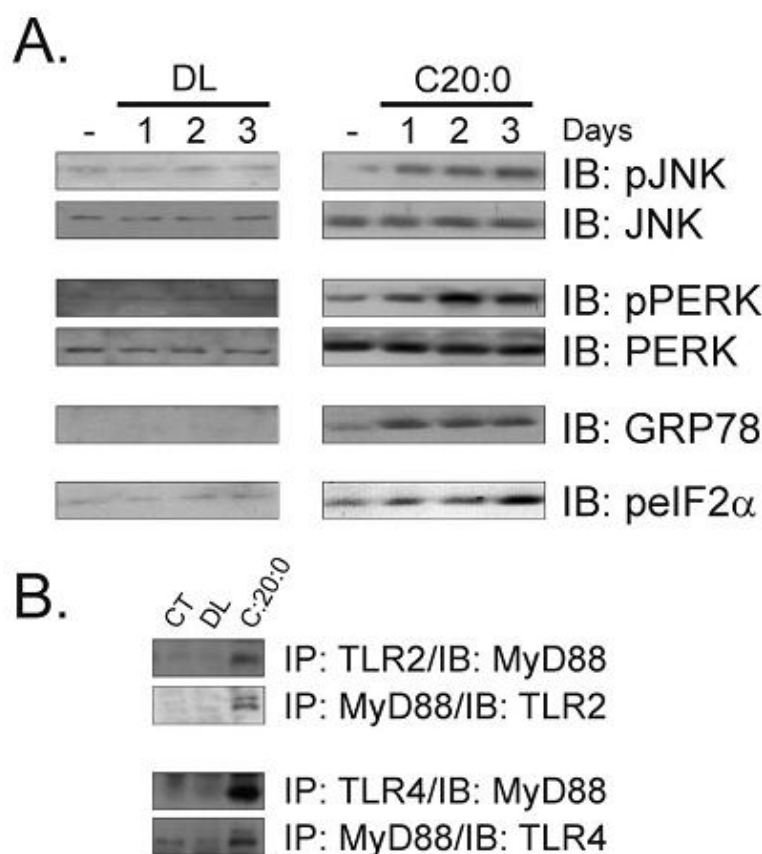


Figure 3. *A*, Immunoblot (IB) analysis of the expressions of pJNK, JNK, pPERK, PERK, GRP78, and pelF2 α in hypothalamic protein extracts obtained from rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL) or arachidic acid (C20:0) for 1–3 d; some rats were intracerebroventricularly cannulated but received no treatment (–). *B*, Immunoprecipitation (IP) analysis of the associations of TLR2 and TLR4 with MyD88 in hypothalamic protein extracts obtained from nonintracerebroventricularly cannulated (CT) rats, and rats treated intracerebroventricularly with DL or C20:0 for 3 d. The depicted blots are representative of five distinct experiments.

Long-chain saturated fatty acids exert the most potent inflammatory stimulus in hypothalamus

To determine the direct effect of different fatty acids in the expression of inflammatory proteins in hypothalamus, rats were intracerebroventricularly cannulated and treated, initially, with the monounsaturated fatty acid, oleic acid or with fatty acid mixtures containing predominantly fatty acids present in VM, or in animal fat (SM). First, to evaluate if the trace amounts of LPS detected in the reagents could interfere with the results by activating TLR2/4 signaling, we treated rats for 3 d with a dose of LPS corresponding to the highest contaminating level determined in our reagents. As depicted in Figure 2A, 3.0 ng LPS, corresponding to 0.075 EU/nmol endotoxin activity, produced no effect on TLR2 or TLR4 signal transduction. Three days intracerebroventricular oleic acid treatment produced significant increases in the expression of IL-6 and IL-10, as determined by immunoblot (Fig. 2B) and real-time PCR (Fig. 2C). VM produced a significant increase of TNF- α and IL-1 β , as determined by immunoblot (Fig. 2B) and significant increases in IL-6 and IL-10, as determined by real-time PCR (Fig. 2C). SM produced significant increases in the expressions in TNF- α , IL-1 β and IL-6, as determined by immunoblot (Fig. 2B), and IL-6 as determined by real-time PCR (Fig. 2C). To further understand the role of each individual fatty acid type to induce cytokine expression in the hypothalamus, rats were intracerebroventricularly treated for 3 d

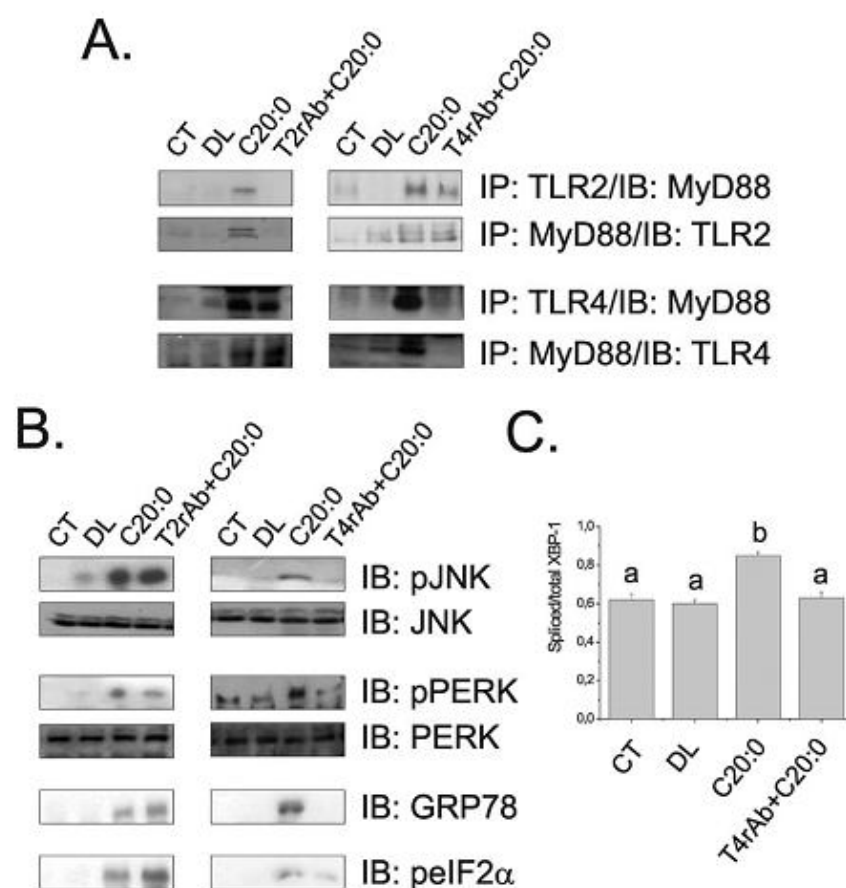


Figure 4. *A*, Immunoprecipitation (IP) analysis of the associations of TLR2 and TLR4 with MyD88 in hypothalamic protein extracts obtained from rats not intracerebroventricularly cannulated (CT), and rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL), arachidonic acid (C20:0), TLR2 receptor antibody plus arachidonic acid (T2rAb + C20:0) or TLR4 receptor antibody plus arachidonic acid (T4rAb + C20:0) for 3 d. *B*, Immunoblot (IB) analysis of expression of pJNK, JNK, pPERK, PERK, GRP78 and pelf2α in hypothalamic protein extracts. *C*, PCR analysis of spliced/total XBP-1 transcripts in hypothalamic samples. In *A* and *B*, the depicted blots are representative of five distinct experiments; in *C*, $n = 5$; different letters mean significant differences between groups, $p < 0.05$.

with palmitic, stearic, linoleic, linolenic, arachidic, or behenic acids. As depicted in Figure 2*D*, the long-chain saturated fatty acids, mostly stearic, arachidic and behenic, induced the expression of inflammatory cytokines. In the case of stearic and arachidic, some stimulus for the expression of IL-10 was also detected.

ER stress and TLR signaling are induced by long-chain saturated fatty acids

To evaluate the effect of long-chain saturated fatty acids on the induction of ER stress, rats were intracerebroventricularly treated from 1 to 3 d with two daily doses of arachidonic acid and the expressions of proteins induced during the UPR were determined by immunoblot. As depicted in Figure 3*A*, UPR was rapidly induced in the hypothalamus of arachidonic acid-treated rats. The expressions of the phosphorylated forms of JNK, PERK and eIF2α and the protein amount of GRP78 were clearly increased after 1–2 d treatment, reaching the highest levels on day 3 (23 ± 4 vs $203 \pm 18^*$ for pJNK, 14 ± 3 vs $265 \pm 21^*$ for pPERK, 12 ± 4 vs 205 ± 16 for GRP78, and 19 ± 8 vs 229 ± 21 for pelf2α; $n = 5$; $p < 0.05$). No induction of UPR was detected in the hypothalamus of control rats. In addition, the increased ratios of spliced/total (0.61 ± 0.07 vs 0.84 ± 0.09 ; $n = 5$; $p < 0.05$) and spliced/

nonspliced XBP-1 (0.49 ± 0.04 vs 0.81 ± 0.07 ; $n = 5$; $p < 0.05$) transcripts further confirmed the ability of arachidonic acid to induce ER stress. The capacity of arachidonic acid to induce signal transduction through TLR2 and TLR4 in the hypothalamus was tested in rats intracerebroventricularly treated for 3 d with this fatty acid. As shown in Figure 3*B*, both TLR2/MyD88 and TLR4/MyD88 associations/activations were induced by the long-chain saturated fatty acid. The greatest effect was seen on TLR4/MyD88 association, which was 5.6-fold (1234 ± 102 vs 222 ± 34 arbitrary scanning units; $n = 5$; $p < 0.05$) more stimulated than TLR2/MyD88, suggesting that TLR4 is the main receptor engaged by the long-chain saturated fatty acid.

Activation of TLR4 is the main event linking long-chain saturated fatty acid to cytokine expression in the hypothalamus

To determine the impact of TLR2, TLR4, and ER stress activation, by long-chain saturated fatty acids, on induction of an inflammatory response in the hypothalamus, specific inhibitors of TLR2, TLR4, and ER stress were used. The inhibition of TLR2 was achieved by intracerebroventricularly treating the rats with a daily dose of an inhibitory TLR2 antibody. This treatment completely blunted arachidonic acid-induced activation of TLR2 signaling (Fig. 4*A*) but promoted no modulation of arachidonic acid-induced activation of TLR4 (Fig. 4*A*) or induction of ER stress (Fig. 4*B*). Conversely, the inhibition of TLR4 by a daily intracerebroventricular dose of an

inhibitory TLR4 antibody completely abolished TLR4 activation (Fig. 4*A*) and ER stress induction (Fig. 4*B*), including the inhibition of the arachidonic acid-induced increase in the spliced form of XBP-1 (Fig. 4*C*). No significant modulation of TLR2 activation was obtained by this approach (Fig. 4*A*). When rats were intracerebroventricularly treated with a daily dose of the chaperone PBA to inhibit ER stress, only the reversal of arachidonic acid-induced ER stress was obtained (Fig. 5*A*), with no impact on TLR2 and TLR4 activation (Fig. 5*B*). Furthermore, the inhibition of TLR4 signaling by the TLR4-inhibiting antibody completely restrained the capacity of arachidonic acid to induce TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 expression (Fig. 6*A–D*). However, PBA treatment only partially inhibited arachidonic acid-induced expression of these cytokines (Fig. 6*A–D*), suggesting that ER stress induction mediates only part of the signals generated by the long-chain saturated fatty acid toward cytokine expression.

TLR4 loss-of-function mutation protects macrophages from saturated fatty acid-induced ER stress activation

To evaluate if the phenomenon described above, in the hypothalamus, could be reproduced in isolated cells, peritoneal macrophages prepared from control (C3H/HeN) and TLR4 loss-of-function mutation (C3H/HeJ) mice were treated for 16 h with

arachidic acid, and the activation of markers of ER stress was determined by flow cytometry. Initially, the specificity of the method was tested by treating the cells from C3H/HeN mice with PBA to chemically inhibit ER stress induction. As shown in Figure 7A, PBA was unable to inhibit arachidic acid-induced F4/80 expression but almost completely blunted fatty acid-induced activation of p-JNK ($89 \pm 6\%$; $p < 0.05$), p-eIF2 α ($93 \pm 4\%$; $p < 0.05$), p-PERK ($79 \pm 5\%$; $p < 0.05$) and GRP78 ($93 \pm 4\%$; $p < 0.05$). When macrophages from C3H/HeJ mice were submitted to a similar treatment, an almost complete inhibition of arachidic acid-induced expression of F4/80 ($86 \pm 4\%$; $p < 0.05$), p-JNK ($88 \pm 5\%$; $p < 0.05$), and GRP78 ($95 \pm 4\%$; $p < 0.05$), a partial inhibition of arachidic acid-induced expression of p-eIF2 α ($58 \pm 9\%$; $p < 0.05$) and p-PERK (69 ± 5 ; $p < 0.05$), were observed (Fig. 7B).

Saturated, but not unsaturated, fatty acid-rich diet leads to resistance to anorexigenic hormone action

As one of the main molecular mechanisms linking the consumption of fat-rich diets to insulin and leptin resistance in peripheral and hypothalamic tissues is the induction of an inflammatory response and the expression/action of inflammatory cytokines, we tested the hypothesis that only the consumption of a saturated fatty acid-rich, and not of an isocaloric unsaturated fatty acid-rich diet, would promote resistance to anorexigenic signals in the hypothalamus. For this, Wistar rats were treated for 8 weeks with CD, HF, or OL diets and evaluated for metabolic parameters and response to intracerebroventricularly injected leptin. The OL diet is isocaloric with HF but contains less saturated fat, as determined by HPLC (HF contains 5.0 g% saturated fat, whereas OL contains 2.8 g% saturated fat). As shown in Figure 8, the consumption of either HF or OL diets led to similar changes in body mass (Fig. 8A) and mean daily caloric intake (data not shown). However, whereas in HF fed rats intracerebroventricularly injected leptin promoted no suppression of food intake, in OL rats, the effect of leptin was similar to controls (Fig. 8B), leading to a 38% reduction in spontaneous food intake over 12 h. In addition, when rats fed for 8 weeks on either HF or OL diets were moved to CD diet for a further 4 weeks, the rate of body mass gain was significantly reduced in previously OL fed rats, whereas in previously HF fed rats, the rate was still higher than control (Fig. 8C).

TLR4 loss-of-function mutation protects from diet-induced body mass gain and from fatty acid-induced hypothalamic cytokine expression

To test the hypothesis that TLR4 mediates most of the effect of dietary saturated fatty acids toward hypothalamic inflammation and impairment of anorexigenic signals, TLR4 loss-of-function mutant mice were fed on an HF diet for 8 weeks and metabolic parameters were determined. As depicted in Figure 8D, whereas control mice presented a 50% body mass gain during the period, the body mass of mutant mice increased by only 30% in the same period. This effect was independent of any significant change in food intake. In addition, TLR4 loss-of-function mutant mice failed to induce a remarkable increase in the expression of IL-6 and IL-10 in hypothalamus, after a 3 d intracerebroventricular treatment with arachidic acid (Fig. 8E,F).

Most TLR4 expression occurs in activated microglia

The cellular distribution of TLR4 in the hypothalamus was evaluated by double-immunofluorescence staining of hypothalamic sections obtained from Wistar rats fed on HF diet for 8 weeks. Most TLR4-positive cells were microglia cells expressing the

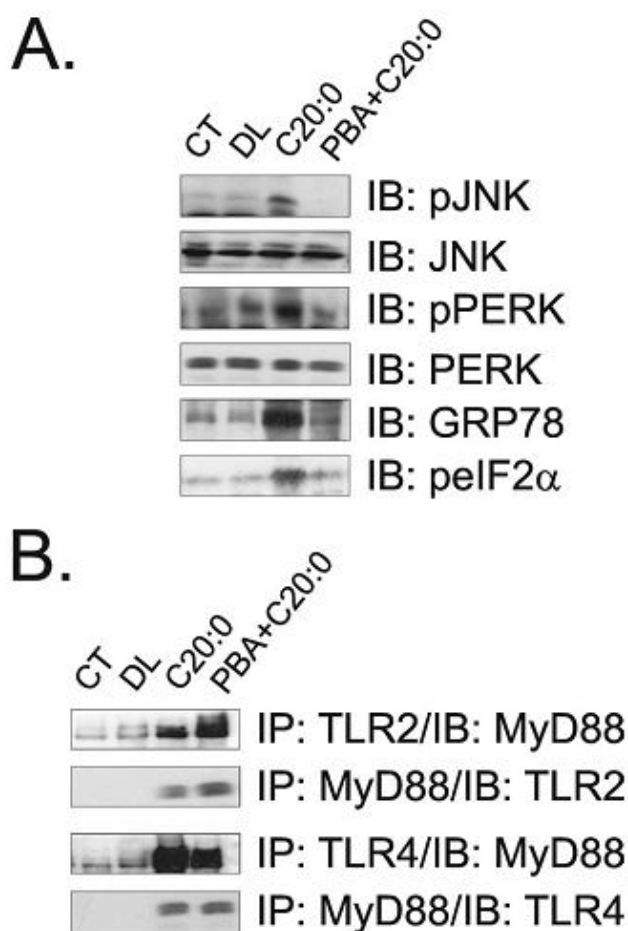


Figure 5. A, Immunoblot (IB) analysis of expression of pJNK, JNK, pPERK, PERK, GRP78, and p-eIF2 α in hypothalamic protein extracts obtained from rats not intracerebroventricularly cannulated (CT), and from rats treated intracerebroventricularly with diluent (DL), arachidic acid (C20:0), or PBA plus arachidic acid (PBA + C20:0) for 3 d. B, Immunoprecipitation (IP) analysis of the associations of TLR2 and TLR4 with MyD88 in hypothalamic protein extracts obtained from rats treated as described in A. The depicted blots are representative of five distinct experiments.

F4/80 protein (Fig. 8G). AgRP and POMC neurons expressed virtually no TLR4 (data not shown).

TLR4 and TLR2 signal transductions are constitutively activated in the hypothalamus of rats fed on high-fat diet

The associations of TLR2 and TLR4 with MyD88 were significantly increased in the hypothalamus of rats fed on HF diet for 8 weeks. As depicted in Figure 8H, HF diet led to $123 \pm 14\%$ ($p < 0.05$) increase in the association TLR2/MyD88 and $321 \pm 23\%$ ($p < 0.05$) increase in the association TLR4/MyD88.

Pharmacological inhibition of TLR4, but not of TLR2 and ER stress, impairs diet-induced body mass gain and leptin resistance

To determine the impact of TLR2/4 activity and ER stress on diet-induced obesity and hypothalamic leptin resistance, Wistar rats were fed on a HF diet for 8 weeks and treated with daily intraperitoneal doses of TLR2-inhibiting antibody, TLR4-inhibiting antibody, or PBA. As shown in Figure 8I, TLR4, but not TLR2 or ER stress inhibitions, completely abolished diet-induced body mass gain independently of significant changes in food intake (data not shown). In addition, TLR4, but not TLR2

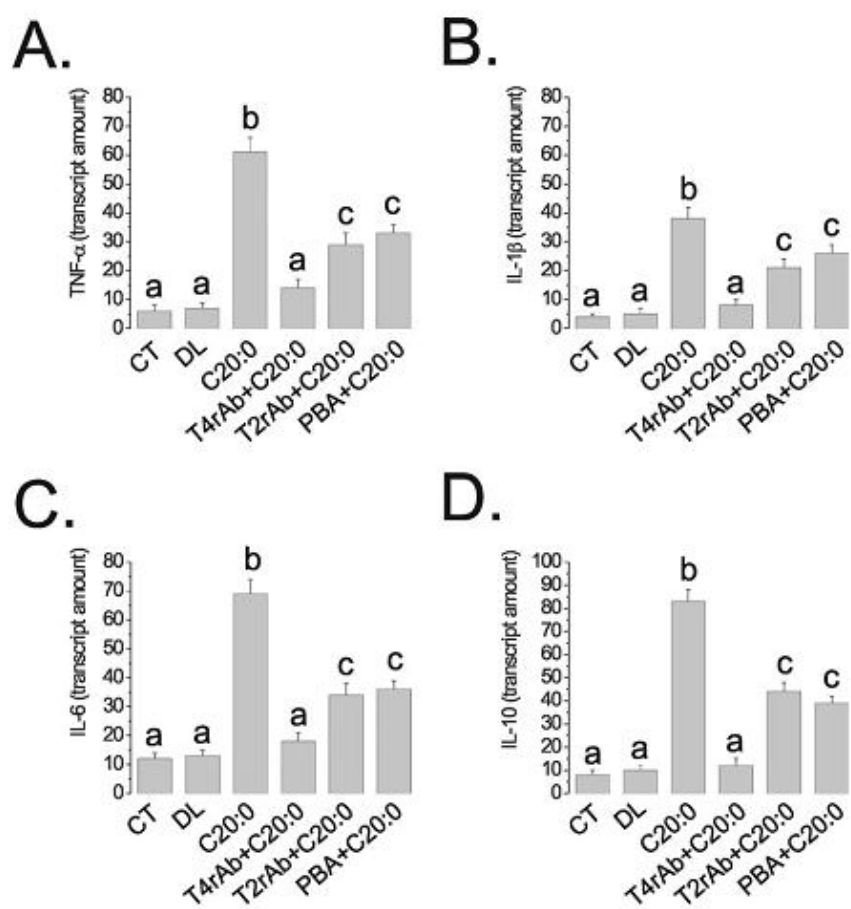


Figure 6. Real-time PCR determination of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) mRNA expressions in hypothalamic samples obtained from rats nonintracerebroventricularly cannulated (CT), or treated intracerebroventricularly with diluent (DL), arachidic acid (C20:0), TLR4 receptor antibody plus arachidic acid (T4rAb+C20:0), TLR2 receptor antibody plus arachidic acid (T2rAb+C20:0) or PBA plus arachidic acid (PBA+C20:0) for 3 d. The results are presented as transcript amount, $n = 5$, and different letters mean significant differences between groups, $p < 0.05$.

and ER stress, inhibition reversed diet-induced leptin resistance in the hypothalamus (Fig. 8J). These effects were accompanied by significant reductions of hypothalamic TNF- α (Fig. 8K), IL-1 β (Fig. 8L), IL-6 (Fig. 8M), and IL-10 (Fig. 8N) expressions by the inhibition of TLR4. Similar results were obtained by inhibiting TLR4 only in the hypothalamus. For that, Wistar rats were fed on HF diet for 8 weeks. During the last 7 d of the protocol, the rats were treated with a daily intracerebroventricular dose of TLR4- or TLR2-inhibiting antibodies. As shown in Figure 9A, only the inhibition of TLR4 was capable of significantly reducing body mass variation. This was accompanied by significant reductions of TNF- α (Fig. 9B), IL-1 β (Fig. 9C), IL-6 (Fig. 9D), and IL-10 (Fig. 9E) expressions.

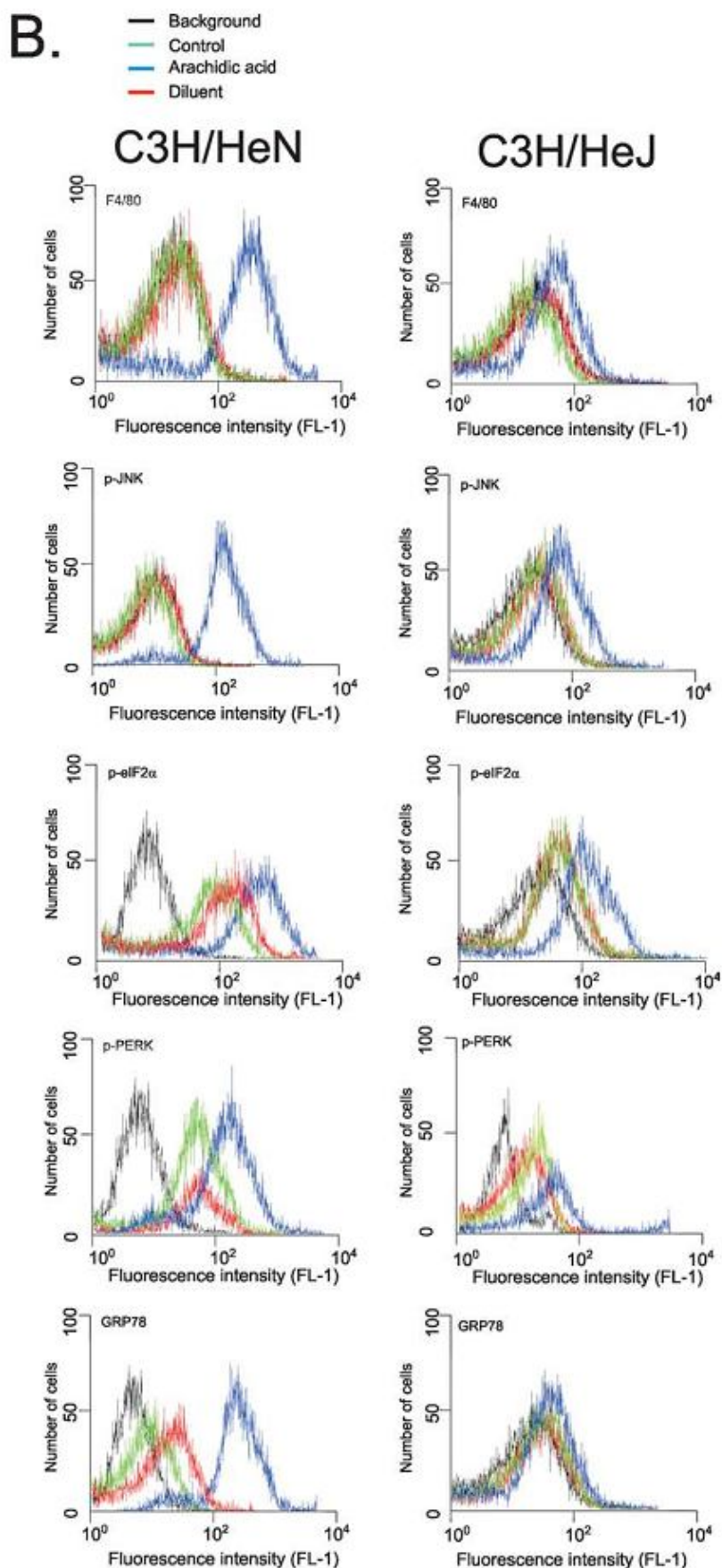
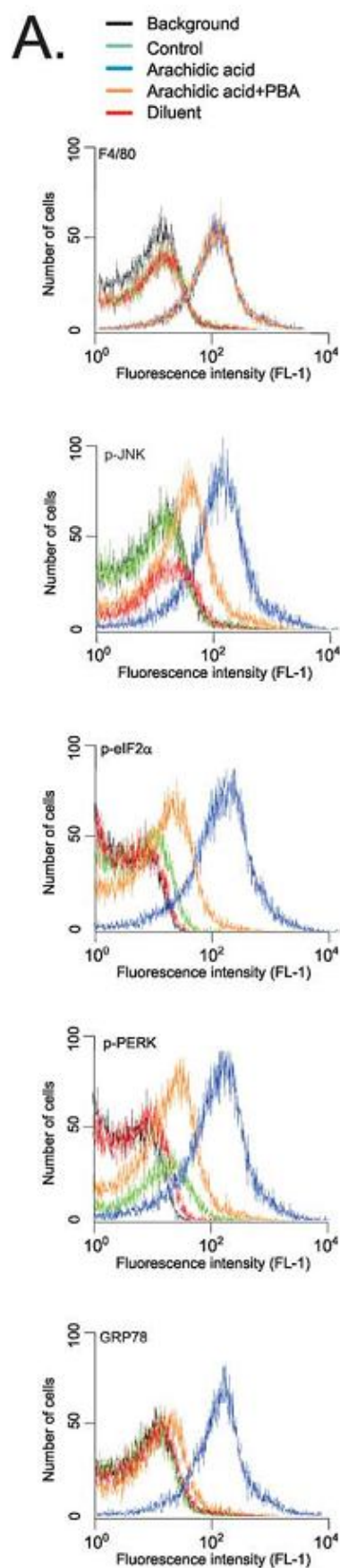
Discussion

Molecular and functional resistance to anorexigenic/thermogenic signaling in the hypothalamus is a common feature of most animal models of obesity (Carvalho et al., 2003; Howard et al., 2004; De Souza et al., 2005; Münzberg and Myers, 2005; Enriori et al., 2007). The main molecular events determining this phenotype are the systemic and local production of cytokines (Howard et al., 2004; De Souza et al., 2005) and the activation of inflammatory pathways in cells of restricted areas of the hypothalamus involved in the control of feeding and thermogenesis (Howard et

al., 2004; De Souza et al., 2005; Prada et al., 2005; Araújo et al., 2007). Although it is generally accepted that consumption of fat-rich diets is among the most important environmental factors leading to obesity, little is known about the mechanisms linking dietary fats to the activation of inflammatory response and impairment of anorexigenic/thermogenic signaling in the hypothalamus. Recently, the activation of TLR signaling and the induction of ER stress have been implicated in the pathogenesis of diet- and obesity-related insulin resistance and diabetes mellitus. In this study, we evaluated the capacity of fatty acids to induce TLR signaling and ER stress in the hypothalamus (Ozcan et al., 2004, 2006; Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007).

Initially, we determined the ability of different fatty acids to induce the expression of cytokines in the hypothalamus. The HF diet contained as much as twofold more saturated fat than the control diet. This is consistent with the amount of saturated fat present in most Western diets and is much beyond that recommended by the guidelines of diabetes, nutrition, and cardiovascular international societies (Shekelle et al., 1981; McKeigue et al., 1985; Dougherty et al., 1988). The rats fed on the HF diet expressed high levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the hypothalamus, and this was accompanied by the increased presence of F4/80-expressing cells, predominantly in the median eminence and arcuate nucleus. These data reinforce the concept that consumption of a fat-rich diet induces an inflammatory response in hypothalamus and suggests that the activation of an innate immune response is implicated in the process (De Souza et al., 2005). Moreover, by ruling out the expression of F4/80 in other regions of the brain, we provide further support for the anatomic specificity of the phenomenon (Howard et al., 2004; De Souza et al., 2005; Enriori et al., 2007).

To evaluate whether fatty acids, acting directly in the hypothalamus, can reproduce the effect of HF diet, rats were intracerebroventricularly treated with different mixtures of fatty acids, and the expression of cytokines was determined. The compositions of the mixtures were chosen based on the expected compositions of vegetable oils and animal fat, particularly soybean oil (Fedeli and Jacini, 1971) and pork lard (Brooks, 1971), respectively. Oleic acid, used as a control, induced only the expression of IL-10 and IL-6, both known to possess anti-inflammatory actions, and therefore, reinforcing the alleged anti-inflammatory property of this fatty acid (Martínez-Domínguez et al., 2001; Yoneyama et al., 2007). Conversely, both the vegetable and the saturated fatty acid mixtures provided consistent stimuli for the expression of inflammatory cytokines, however, with the greater effect induced by the saturated mixture. When pure saturated and unsaturated fatty acids were tested separately, there was a clear difference with greatest inflammatory effect produced by long-chain saturated fatty acids. Although some previous studies



have evaluated the abilities of fatty acids to induce cytokine expression, this is the first time the phenomenon has been shown in the hypothalamus (de Pablo and Alvarez de Cienfuegos, 2000; Pompéia et al., 2000).

Arachidic acid is a 20-carbon saturated fatty acid present in triacylglycerols from animal fat and some vegetable oils (Hlongwane et al., 2001). We decided to employ this fatty acid in the remainder of the experiments because it produced the highest stimulus for TNF- α expression in the hypothalamus and because some previous reports have shown its property to be transported across the blood–brain barrier (Strosznajder et al., 1996). When intracerebroventricularly injected in the hypothalamus, arachidic acid rapidly induced the activation of ER stress and TLR2 and TLR4 signaling. These were specific events, because no effect was seen with the intracerebroventricular injection of the diluent BSA, and complete inhibition was achieved using specific inhibitors for each pathway tested. Interestingly, in the experiments performed to evaluate TLR activation, the bands obtained when immunoprecipitation was performed with anti-TLRs and blotting with anti-MyD88 antibodies, were different in density compared with bands produced by anti-MyD88 immunoprecipitation and anti-TLRs blotting. Although we have no current explanation for this fact, we suspect that it can be attributable to differences in stoichiometric ratio between the receptors and the adaptor protein, because other adaptor proteins can bind to these receptors (Tanimura et al., 2008).

In previous studies, when TLR signaling and ER stress were evaluated in the context of diet- and genetic-induced obesity, insulin resistance was produced by the activation of intracellular inflammatory signaling through JNK and/or IKK, and further enhanced by the induction of proinflammatory cytokine expression (Ozcan et al., 2004, 2006; Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007). However, the possible interaction between both mechanisms was never tested. Here, to explore the hypothesis that TLR signaling and ER stress can interact, at the intracellular level, and to evaluate the possibility that one of these mechanisms could in fact lead to or potentiate the other, we performed specific inhibitions of TLR2, TLR4, and ER stress and evaluated the capacity of arachidic acid to induce activation of each one. Our results show that the inhibition of one of the TLRs does not interfere with the activation of the other. However, only the inhibition of TLR4 completely blunts arachidic acid-induced ER stress, suggesting that TLR4 activation precedes and determines ER stress induction. This was further confirmed by studying isolated macrophages from TLR loss-of-function mutation mice. Conversely, the inhibition of ER stress fails to modulate TLR signaling. In addition, when comparing the activation of both TLRs, it is clear that arachidic acid produces a much stronger signal for the activation of TLR4 than TLR2, which is consistent with the fact that TLR2/1 and TLR2/6 dimmers recognize preferentially diacyl and triacyl lipopeptides, respectively, whereas TLR4 recognizes fatty

acids contained in LPS and also free fatty acids (Shimazu et al., 1999; Takeuchi et al., 2001; Akira, 2003; Akira et al., 2006). Finally, the *in situ* inhibition of TLR4 or the genetic disarrangement of this receptor, as it occurs in the TLR4 loss-of-function mutant, completely inhibits arachidic acid induction of cytokine expression, whereas PBA treatment only partially modulates this response. Thus, at the cellular level, the long-chain saturated fatty acid acts predominantly through TLR4, leading to an inflammatory response that can be potentiated by the activation of ER stress, which is also dependent on TLR4 engagement.

The specificity of the response to saturated fatty acids was further investigated by feeding rats isocaloric hyperlipidic diets rich in saturated or unsaturated fat. Although food intake and body mass gain is the same, independently of the diet composition, the anorexigenic response to leptin is preserved in OL rats while completely blunted in HF rats. In addition, the replacement of hyperlipidic diets by normolipidic diet shows that previous consumption of HF diet acts as an imprint that predisposes to continuous high rate body mass gain while a significant decrease in the rate of body mass gain occurs in previously OL fed rats. Thus, the induction of resistance to anorexigenic signaling depends more on diet composition than on caloric value.

In the last part of the study, we show that a functional TLR4 signaling is required for the induction of dietary obesity. Initially, we show that most TLR4 present in the hypothalamus of rats fed on HF diet is expressed in microglia, placing the innate immune system in the center of this process. TLR4 loss-of-function mutation does not affect food intake but protects mice from obesity induced by hypercaloric-hyperlipidic diet, whereas TLR4, but not ER stress pharmacological inhibition, preserves the anorexigenic response to leptin and inhibits diet-induced obesity. In a previous study, some of these questions were addressed, and the protection from diet-induced obesity in C3H/HeJ was mostly related to energy expenditure than to control of feeding, which seem to be the case here, because no change in food intake was seen (Tsukumo et al., 2007). In addition, inhibition of ER stress by chemical means promoted no change of body mass in ob/ob mice (Ozcan et al., 2006).

In conclusion, saturated fatty acids activate TLR2 and TLR4 signaling and ER stress in hypothalamus. The greatest signal is delivered through TLR4, which determines ER stress induction (Fig. 10). The presence of a functional TLR4 signaling is required for the development of hyperlipidic dietary obesity. Thus, in addition to its important role in the development of diet- and obesity-related insulin resistance and diabetes mellitus, TLR4 is an important mediator of hypothalamic dysfunction during the development of obesity. As hypothalamic resistance to anorexigenic signaling is a very incipient phenomenon during the installation of obesity (Prada et al., 2005), TLR4 is an attractive target for therapeutics of this epidemic condition.

References

- Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278:38105–38108.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801.
- Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carnevali JB, Saad MJ, Velloso LA (2007) Influx of glucose restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 148:5991–5997.
- Bertolo MB, Araújo EP, Cesquini M, Stoppa GR, Gasparotto-Contessotto M, Toyama MH, Felix JV, Carnevali JB, Michelini LC, Chiavegatto S, Boschero AC, Saad MJ, Lopes-Cendes I, Velloso LA (2006) Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositol trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 147:5385–5399.

←

Figure 7. Flow cytometry analysis of expressions of F4/80, p-JNK, p-elf2 α , p-PERK, and GRP78 in isolated macrophages. **A**, Macrophages from C3H/HeN mice were plated and incubated for 16 h in the presence of arachidic acid (blue), arachidic acid plus PBA (orange) or diluent (red). After harvesting, the cells were incubated with specific primary antibodies and then labeled with secondary conjugated antibody. Signal detection was performed by flow cytometry. **B**, Macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice were plated and incubated for 16 h in the presence of arachidic acid (blue) or diluent (red). After harvesting, the cells were incubated with specific primary antibodies and then labeled with secondary conjugated antibody. Signal detection was performed by flow cytometry. Graphs are representative of $n = 5$. Background counts (black); control, not added primary antibody (green).

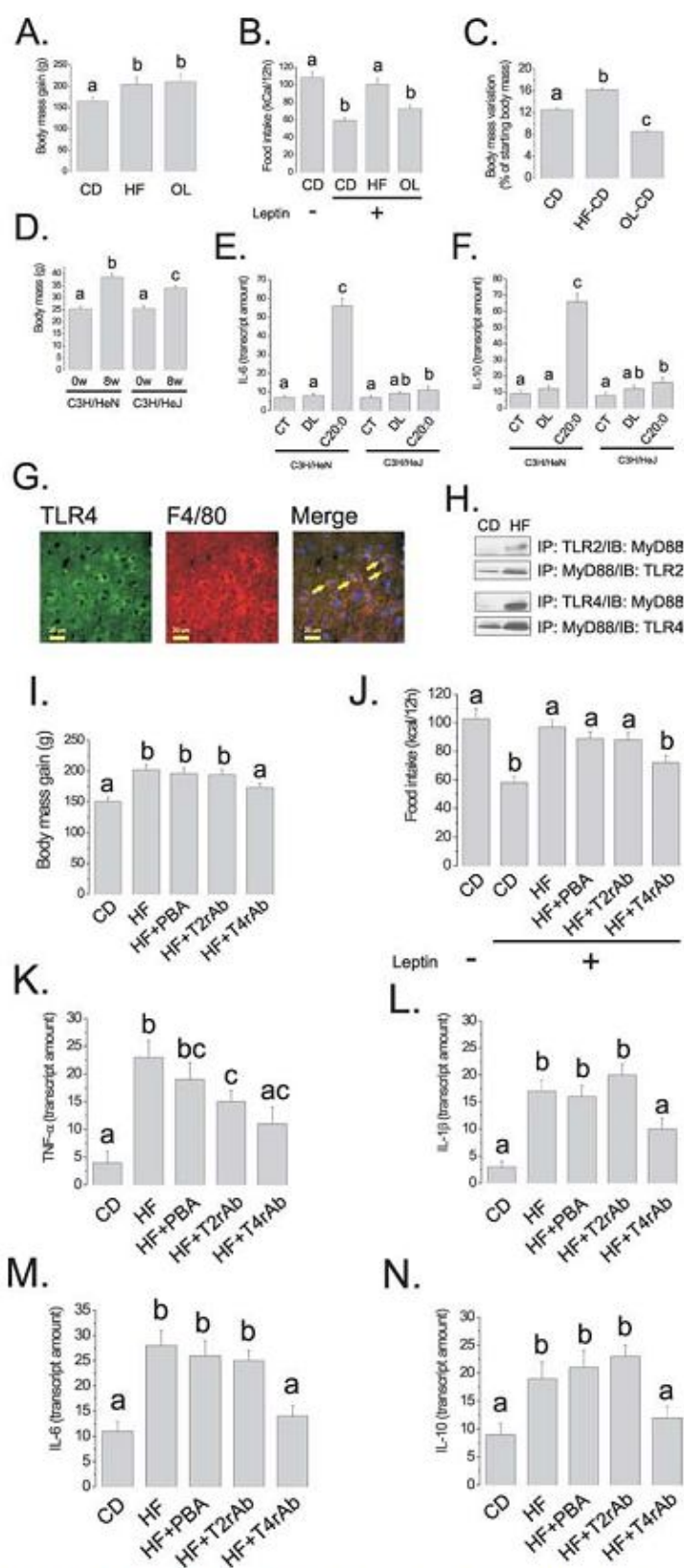


Figure 8. *A–C*, Rats were fed on CD, HF, or OL diets for 8 weeks; body mass variation (*A*) was determined during the experimental period. At the end of the experimental period, rats were treated intraperitoneally with saline (100 μ l) (–) or a similar volume of leptin (10^{–6} M) (+), and spontaneous food intake was determined over 12 h (*B*). After 8 weeks on either diet, HF and OL rats were reallocated to CD diet for a further 4 weeks, and body mass variation was determined (*C*). *D*, C3H/HeN and C3H/HeJ mice were fed on a saturated-rich high-fat diet for 8 weeks, and body mass was determined in the first (0w) and last days (8w) of

Brooks CC (1971) Fatty acid composition of pork lipids as affected by basal diet, fat source and fat level. *J Anim Sci* 33:1224–1231.

Carvalho JB, Ribeiro EB, Araújo EP, Guimarães RB, Telles MM, Torsoni M, Gontijo JA, Veloso LA, Saad MJ (2003) Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46:1629–1640.

de Pablo MA, Alvarez de Cienfuegos G (2000) Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol* 78:31–39.

De Souza CT, Araújo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Veloso LA (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192–4199.

Dougherty RM, Fong AK, Iacono JM (1988) Nutrient content of the diet when the fat is reduced. *Am J Clin Nutr* 48:970–979.

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nilini EA, Grove KL, Cowley MA (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 5:181–194.

Fedeli E, Jacini G (1971) Lipid composition of vegetable oils. *Adv Lipid Res* 9:335–382.

Freire RD, Cardoso MA, Gimeno SG, Ferreira SR (2005) Dietary fat is associated with metabolic syndrome in Japanese Brazilians. *Diabetes Care* 28:1779–1785.

Hlongwane C, Delves IG, Wan LW, Ayorinde FO (2001) Comparative quantitative fatty acid analysis of triacylglycerols using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and gas chromatog-

the experimental periods. *E, F*, Real-time PCR determination of IL-6 (*E*) and IL-10 (*F*) mRNA expressions in hypothalamic samples obtained from C3H/HeN and C3H/HeJ mice non-intracerebroventricularly cannulated (CT), or treated intracerebroventricularly with diluent (DL) or arachidic acid (C20:0). *G*, Double-immunofluorescence staining of TLR4 and F4/80 in the arcuate nucleus of rats fed on high-fat diet for 8 weeks, the arrows depict double-positive cells. *H*, Immunoprecipitation (IP) analysis of the associations of TLR2 and TLR4 with MyD88 in hypothalamic protein extracts obtained from rats fed on CD or HF diets for 8 weeks. *I, J*, Rats were fed on CD or HF diets for 8 weeks. Throughout the period, the rats were treated with a daily intraperitoneal dose of PBA (HF + PBA), TLR2-inhibiting antibody (HF + T2rAb), or TLR4-inhibiting antibody (HF + T4rAb). Body mass variation (*I*) was determined. At the end of the experimental period, rats were treated intraperitoneally with saline (100 μ l) (–) or a similar volume of leptin (10^{–6} M) (+), and spontaneous food intake was determined over 12 h (*J*). *K–N*, Real-time PCR determination of TNF- α (*K*), IL-1 β (*L*), IL-6 (*M*) and IL-10 (*N*) mRNA expressions in hypothalamic samples obtained from rats treated according to the same protocol as for *I, J*. In all experiments, except *G*, *n* = 5; different letters mean significant differences between groups, *p* < 0.05. *G*, Microphotographs are representative of three distinct experiments; nuclei are stained with DAPI. The depicted blots are representative of five distinct experiments.

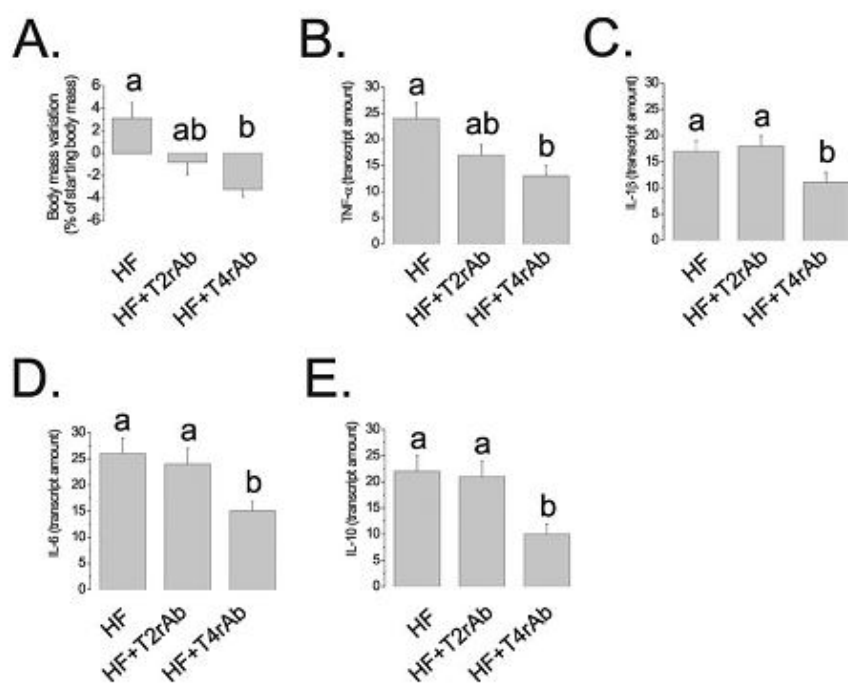


Figure 9. A, Rats were fed on high-fat diet for 8 weeks. During the last 7 d of the protocol, the rats were intracerebroventricularly treated with saline (HF), TLR2-inhibiting antibody (HF+T2rAb), or TLR4-inhibiting antibody (HF+T4rAb). Body mass change was measured over the 7 d (A). At the end of the experimental period, hypothalami were obtained for real-time PCR analysis of TNF- α (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), and IL-10 (E) mRNA determination. In all experiments, $n = 5$; different letters mean significant differences between groups, $p < 0.05$.

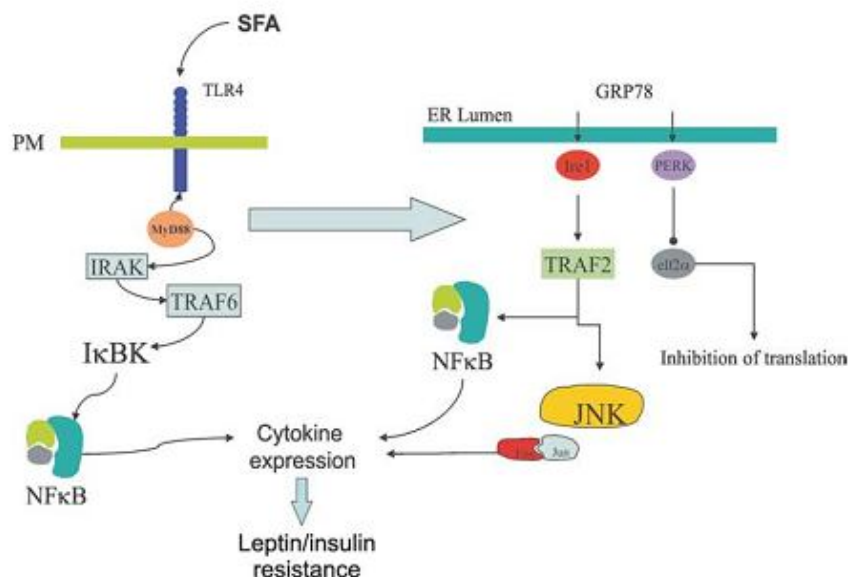


Figure 10. Proposed mechanism for saturated fatty acid (SFA)-induced activation of inflammatory response in hypothalamus. Initially, SFA activates predominantly TLR4, engaging MyD88. The classical downstream signaling through IRAK/TRAF6/NF- κ B (not tested in the present study) leads to cytokine expression. Through a hitherto unknown mechanism, TLR4 activation induces ER stress, which boosts cytokine expression enhancing the inhibitory signals of anorexigenic hormone action.

raphy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:2027–2034.
Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 10:734–738.
Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidegger C (2004) The I κ B kinase complex and NF- κ B act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* 24:6488–6500.

Marciniak SJ, Ron D (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86:1133–1149.
Martinez-Dominguez E, de la Puerta R, Ruiz-Gutiérrez V (2001) Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm Res* 50:102–106.
Martins EF, Miyasaka CK, Newsholme P, Curi R, Carpinelli AR (2004) Changes of fatty acid composition in incubated rat pancreatic islets. *Diabetes Metab* 30:21–27.
McKeigue PM, Marmot MG, Adelstein AM, Hunt SP, Shipley MJ, Butler SM, Riemersma RA, Turner PR (1985) Diet and risk factors for coronary heart disease in Asians in northwest London. *Lancet* 2:1086–1090.
Moreno LA, Rodriguez G (2007) Dietary risk factors for development of childhood obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:336–341.
Münzberg H, Myers MG Jr (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8:566–570.
Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M (2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 280:847–851.
Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, Tamatani T, Yamagata K, Miyagawa J, Kitao Y, Hori O, Yamasaki Y, Ogawa S (2005) The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* 54:657–663.
Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457–461.
Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vailancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137–1140.
Pahl HL, Baeuerle PA (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF- κ B. *EMBO J* 14:2580–2588.
Pompéia C, Lopes LR, Miyasaka CK, Procópio J, Sannomiya P, Curi R (2000) Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res* 33:1255–1268.
Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Höer NF, Boschero AC, Saad MJ (2005) Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146:1576–1587.
Schröder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569:29–63.
Shekelle RB, Shryock AM, Paul O, Lepper M, Stamler J, Liu S, Raynor WJ Jr (1981) Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric study. *N Engl J Med* 304:65–70.
Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015–3025.
Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M

- (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777–1782.
- Stein CJ, Colditz GA (2004) The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2522–2525.
- Strosznajder J, Chalimoniuk M, Strosznajder RP, Albanese V, Alberghina M (1996) Arachidonate transport through the blood-retina and blood-brain barrier of the rat during aging. *Neurosci Lett* 209:145–148.
- Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933–940.
- Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368:94–99.
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986–1998.
- Watowich SS, Morimoto RI, Lamb RA (1991) Flux of the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein through the endoplasmic reticulum activates transcription of the GRP78-BiP gene. *J Virol* 65:3590–3597.
- Weinstein JR, Swarts S, Bishop C, Hanisch UK, Möller T (2008) Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia* 56:16–26.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656–2664.
- Yoneyama S, Miura K, Sasaki S, Yoshita K, Morikawa Y, Ishizaki M, Kido T, Naruse Y, Nakagawa H (2007) Dietary intake of fatty acids and serum C-reactive protein in Japanese. *J Epidemiol* 17:86–92.

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO

- Dentre os ácidos graxos testados nesse estudo, os saturados de cadeia longa exerceram o mais potente efeito na indução de resposta inflamatória no hipotálamo.
- Ácidos graxos saturados ativam a sinalização através de TLR2 e TLR4 e induzem estresse de RE em hipotálamo de roedores.
- A ativação em resposta ao ácido araquídico é mais significativa para TLR4, que por sua vez determina a indução de estresse de RE.
- Animais alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos monoinsaturados preservam maior sensibilidade à leptina quando comparados aos animais que são alimentados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados.
- TLR4 é um importante mediador da disfunção hipotalâmica durante o desenvolvimento da obesidade. Como esse é um fenômeno importante durante a instalação da obesidade, TLR4 é um alvo terapêutico atrativo para tal condição epidêmica.

APÊNDICE

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar de oito a dez semanas de idade provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB), os quais foram alimentados com ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1) da Nuvital, oferecidas *ad libitum*, assim como água. Também foram utilizados camundongos mutantes TLR4 C3H/HeJ e seu controle C3H/HeN, obtidos do laboratório Jackson e providos pela Universidade de São Paulo, os quais foram alimentados com ração comercial para roedores ou dieta hiperlipídica. Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) e os camundongos em gaiolas individuais, sob condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas.

Cirurgia Estereotáxica

Ao atingirem oito semanas de idade, os ratos foram submetidos à canulação do ventrículo lateral. Os animais (250 – 300 g) foram previamente anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de 70 % cloridrato de cetamina (50 mg/ml) e 30 % de diazepam (5,0 mg/ml). Depois de testados e garantidos os reflexos corneal e pedioso, os animais foram posicionados no aparelho de estereotaxia para implantação de uma cânula no ventrículo lateral do hipotálamo, seguindo as coordenadas do Atlas Paxinos-Watson (49) que variam de acordo com o peso do animal. Em ratos de aproximadamente 300 g

as coordenadas utilizadas foram AP: 0,2 mm; lateral: 1,5 mm; profundidade: 4,0 mm.

Infusão intracerebroventricular

Após o período de uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a um teste de resposta de ingestão hídrica subsequente ao tratamento com angiotensina II (2,0 μ L de solução 10^{-6} M) para avaliação da adequação da posição da cânula. Ratos com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados e utilizados nos experimentos.

Para a infusão intracerebroventricular foi utilizada uma seringa Hamilton (50 μ L) acoplada, por meio de uma cânula plástica, a uma agulha 30 G, de modo que esta ultrapassasse o comprimento da cânula metálica (0,1 - 0,2 mm) garantindo a entrada do líquido no ventrículo lateral.

Na primeira etapa os animais foram canulados e randomicamente divididos em quatro grupos e tratados por via intracerebroventricular (icv) com 2 μ L duas vezes ao dia (9h e 16h) por cinco dias com: albumina (DL); ácido oléico (C18:1); mistura vegetal (VM) (composto por 20 % de ácido oléico; 20 % de mistura de saturados; 30 % de ácido linolênico e 30 % de ácido linoléico) e com mistura de saturados (SM) (composto por 20 % de cada um dos seguintes ácidos graxos saturados: ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido araquídico (C20:0) e ácido behênico (C22:0) na seguinte concentração: ácidos graxos 90 μ M; BSA: 2,70 μ M e 0,04% HBP).

Para verificar o efeito isolado de cada ácido graxo, os animais foram tratados icv por cinco dias, sendo dois tratamentos diários de 2 µL (9h e 16h), com cada um dos ácidos graxos que compunham a mistura de saturados, e alguns grupos controles com ácidos graxos insaturados: albumina (DL); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido araquídico (C20:0); ácido behênico (C22:0); ácido oléico (C18:1); ácido linoléico (C18:2) e ácido linolênico (18:3) na seguinte concentração: ácidos graxos 90 µM; BSA: 2,70 µM e 0,04 % HBP.

Nos experimentos em que analisamos a ativação das vias de estresse de retículo endoplasmático (RE) e *Toll-like Receptor 2* e 4 (TLR2/4) e de seus respectivos bloqueios, foram utilizados dois grupos de animais tratados icv por três dias, duas vezes ao dia, com: albumina (BSA) e ácido araquídico (C20:0). Para o bloqueio de estresse de retículo endoplasmático, nós utilizamos a chaperona química PBA (*4-phenylbutyric acid*; P21005-Aldrich) na dose de 125 µg/dia e para o bloqueio do TLR2/4, nós utilizamos um anticorpo anti-TLR2 (sc 16237) e anti-TLR4 (sc 13591) na dose de 25 ng/dia.

Avaliação de ingestão alimentar

Para o experimento em que analisamos a ingestão alimentar em resposta a dieta hiperlipídica composta predominantemente por ácidos graxos monoinsaturados, os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e divididos em três grupos: um grupo recebeu dieta controle (10 % do valor calórico em lipídios); e dois grupos receberam dieta hiperlipídica (59 % do valor calórico em lipídios, adaptada a partir da AIN 93G) (50), sendo que um

grupo recebeu dieta predominantemente composta de ácidos graxos saturados (HS) e outro grupo recebeu dieta predominantemente composta de ácido graxo monoinsaturado (HAO) (Tabela 1) por oito semanas.

Durante o período de dieta, a ingestão alimentar de 24 horas foi avaliada uma vez por semana pela aferição da diferença de peso entre a dieta oferecida e a dieta restante. Depois das oito semanas recebendo essas dietas, os ratos retornaram a dieta controle e foi feita a avaliação de ingestão de 24 horas durante as quatro semanas de recuperação. O ganho de peso dos animais foi avaliado em todas as etapas desse tratamento.

Tabela 1 – Composição das dietas

Ingredientes	Controle (g)	Hipelipídica rica em saturados (g)	Hiperlipídica rica em monoinsaturados (g)
Amido	467,5	115,5	115,5
Caseína	200,0	200,0	200,0
Amido de Milho dextrinizado	132,0	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0	-
Banha de porco	-	312,0	-
Azeite de Oliva	-	-	352,0
Celulose microfibras (fibra)	50,0	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Total	1000,0	1000,0	1000,0

** AIN 93 G*

Teste de sensibilidade à leptina

A ingestão alimentar em resposta a leptina foi avaliada antes e depois de receberem as dietas descritas, sendo feita da seguinte forma: dois dias antes do início da dieta hiperlipídica e após o período de dieta (oito semanas) os animais foram mantidos em jejum por 6 horas. Às 18 h os ratos foram submetidos ao tratamento icv com leptina 10^{-6} M e a ingestão de 12 horas foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola.

Dissecção do hipotálamo

Os animais foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15 mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneano foi utilizada como controle da anestesia. O crânio foi aberto, o hipotálamo retirado e em seguida congelado a -70°C , ou então, homogeneizado em aproximadamente 10 volumes de tampão de solubilização contendo 1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C em “Polytron PTA 20S Generator” (Brinkmann Instruments mode PT 10/35) com velocidade máxima por 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm a 4°C em um rotor “Beckman 70,1”, por 30 minutos para remoção de material insolúvel. A proteína total do sobrenadante foi determinada por meio do método colorimétrico pela reação do biureto (51) com leitura 540 nM por ELISA. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de imunoprecipitação (52) e

preparação de extrato total protéico (ET), ou ainda fragmentos do hipotálamo foram homogeneizados em TriZol para subsequente extração de RNA.

Imunoprecipitação

Para verificar a associação entre TLR2/4 e MyD88, foi empregado o método de imunoprecipitação. As amostras solubilizadas foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi retirado para imunoprecipitação. Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas por 12 a 14 horas, a 4 °C com anticorpos específicos. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6MB por 2 horas a 4 °C e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4 °C/11.000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem contendo: 2,0 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 0,5% Triton X-100. O sobrenadante foi descartado restando apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos) (53). Os imunocomplexos foram ressuspensos em 25 µl de tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT.

Western Blotting

Após rápida fervura (5 min/100°C) dos extratos totais protéicos ou dos imunocomplexos ressuspensos em tampão de Laemmli, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD banhadas com tampão de transferência durante 2 horas a 120 Volts em gelo. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com um anticorpo específico. A ligação do anticorpo às proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação das membranas de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02 % de Tween 20) por 2 horas. A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimiluminescência utilizando um kit da Amersham e seguindo as orientações do fabricante. Após a revelação das auto-radiografias as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica (53,54).

Extração de RNA

Foi feita extração de RNA total de hipotálamo de ratos tratados com ácidos graxos, bloqueadores das vias ou veículo, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen). Para a produção do DNAC, utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), sendo a concentração final do DNAC de 3 µg para os experimentos subseqüentes.

PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR

Alíquotas de 5,0 ng de RNA foram submetidas à transcrição reversa utilizando-se primers hexaméricos randômicos e Superscrit Maloney MLV transcriptase reversa. A avaliação de resultados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3 %. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene GAPD (TaqMan™ - Applied Biosystems) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625 µL da solução de primers e sonda, 1,625 µL de água e 4,0 µL de DNAc, sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do DNAc. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems).

Splicing do XBP-1

Para analisarmos se havia a presença de estresse de retículo endoplasmático, verificamos o *splicing* do XBP-1 (*X-box binding protein*) adaptando a técnica utilizada por Hirota et al. (55). O RNA total de hipotálamo de ratos tratados com ácido araquídico (C:20) ou veículo (BSA) foi extraído, sendo a concentração final do DNAC de 3 µg. Foram utilizados os pares de *primers* para o gene XBP-1 com a seguinte seqüência: Sense 5' AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC 3' e Anti-sense 5' GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG 3' e 2 µL de DNAC para a reação de PCR (38 ciclos, sendo 95 °C por 5 minutos, 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos, 72 °C por 3 minutos). A reação foi visualizada em gel de agarose 1,5 %, corado com SYBR safe (Invitrogen), através de sua exposição à luz ultravioleta (UV). Desta reação foi retirado 10 µL, aos quais foram adicionados 0,8 µL da enzima Pst1 e 4,2 µL de água ultrapura. As amostras foram deixadas a 37 °C por 5 horas e então novamente analisadas em gel de agarose 1,5 %. As bandas resultantes foram quantificadas por densitometria. O *splicing* do gene XBP-1 foi avaliado através da ocorrência ou não da digestão do fragmento amplificado na PCR. A enzima Pst1 reconhece alguns sítios do fragmento do RNAm de XBP-1 e quando ocorre *splicing*, a enzima Pst1 perde seu sítio de corte e o fragmento gerado é do mesmo tamanho do fragmento da PCR. O *splicing* foi medido através da razão: fração não digerida do PCR de XBP-1 dividida pela PCR total de XBP-1. Os valores mais próximos de 1,0 indicam a presença de maior estresse de retículo enquanto que valores próximos de zero, menor ativação de estresse de retículo.

Histologia

O cérebro de ratos alimentados com dieta hiperlipídica ou controle por oito ou dezesseis semanas foi rapidamente dissecado seguindo-se orientação do Atlas de Coordenadas Estereotáticas (49), fixado em formalina a 3 % e armazenado em blocos de parafina. O tecido foi seccionado em micrótomo em secções de 5 µm e colocado em lâminas previamente tratadas com polilisina. As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 60 °C desparafinizadas em xileno e reidratadas em álcool 100 %, 95 % e finalmente 70 %, a seguir tratadas com água destilada. A expressão de F4/80 e a co-imunolocalização de TLR4 com F4/80, AgRP e POMC foi avaliada por coloração indireta com imunofluorescência, como descrita previamente (56). A expressão de F4/80 foi avaliada no hipotálamo, no tálamo, no hipocampo e no córtex frontal, parietal, occipital e cerebelar. A imunolocalização foi determinada no hipotálamo.

Análise dos ácidos graxos por HPLC

Extração lipídica

O método utilizado foi uma adaptação da metodologia de Folch et al. (57), onde as amostras de hipotálamo, de ácidos graxos usados no tratamento ou de dietas foram homogeneizadas e adicionadas em metanol, seguido de agitação. Com este procedimento, as proteínas desnaturam-se. Após a adição de clorofórmio e PBS, os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 15.000 g por 1 minuto. Com a formação de uma solução bifásica, foi efetuada a separação da fase superior (hidrometanólica) para reextração. Esta fase foi

transferida para um tubo Eppendorf com adição de clorofórmio e metanol. O tubo Eppendorf foi agitado em vórtex, centrifugado e a fase superior descartada. Aos extratos clorofórmicos resultantes das duas extrações foi adicionada solução de clorofórmio: metanol: água (solvente de Folch). Cada amostra foi agitada e centrifugada e, após o descarte da fase superior (hidrometanólica), a fase orgânica foi evaporada em *Speed-vac* (Refrigerated Condensation Trap - SC 110 - Savant).

Saponificação das amostras

Os extratos lipídicos obtidos provenientes das amostras foram ressuspensos em metanol e saponificados em uma solução alcalina em metanol a 37°C, por 2 horas, em banho-maria com agitação. Após, a solução alcalina foi acidificada até aproximadamente pH 3,0. Os ácidos graxos em solução foram extraídos com hexano. O solvente foi evaporado e as amostras foram guardadas em ambiente de N₂, protegidas da luz, à -20 °C.

Derivatização dos ácidos graxos com bromometil-metóxi-coumarina

A reação foi baseada no método descrito por Abushufa et al (58). A solução foi sonicada por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução estocada a -20°C. As amostras foram reconstituídas em acetonitrila e diluídas nesta solução. As amostras foram analisadas por sistema de HPLC – Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com duas bombas (mod. LC-10AD), auto-injetor (mod. SIL-10A) e detector de fluorescência (mod. RF-535) e coluna de fase reversa Supelcosil LC-8 com 25 cm x 4,6 mm x 5 µm

(cód. 5-8297) (Supelco, Bellefonte – USA), precedida de uma pré-coluna Supelguard Supelcosil LC-8Kit com 2 cm x 4,6 mm x 5 µm (cód. 5-9552) (Supelco, Bellefonte – USA). Os comprimentos de onda de excitação e emissão no detector de fluorescência utilizadas foram 295 nm e 325 nm, respectivamente. A fase móvel (acetonitrila/água 73/23 v/v) teve uma vazão de 1,0 mL/min. O programa de integração e registro de dados utilizado foi o Class LC-10, versão 1.4. (59).

Cultura primária de macrófagos

Isolamento

Tioglicolato de sódio (2%) foi injetado via intraperitoneal em camundongos C3H/HeJ e C3H/HeN (camundongo controle). Após dois dias, os animais tratados receberam dose letal de tipental sódico (20 mg/Kg) e em seguida foi injetado 2 ml de PBS (pH 7,4) na cavidade intraperitoneal dos animais. Posteriormente, o abdômen foi massageado por aproximadamente 30 segundos e em seguida, o peritônio foi aberto e com auxílio de pipeta Pasteur, o fluido contendo as células foi removido. O fluido foi lavado duas vezes em PBS (pH=7,4) por 8 min a 5000 *rpm* e 28°C. Após centrifugação, a viabilidade e quantificação dos macrófagos foi realizada em câmara de Neubauer após coloração com azul de Trypan. Os macrófagos viáveis foram plaqueados na densidade de 1×10^5 céls/mL em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (10 %) e antibióticos a 37°C e atmosfera de 5 % de CO₂.

Manutenção de macrófagos *in vitro*

As células obtidas foram cultivadas em placas de cultura contendo 2,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/I) e estreptomicina (10 mg/mL) em uma densidade final de $1,0 \times 10^5$ células viáveis/mL, incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ por duas horas. As células não aderentes foram removidas por inversão da placa e os macrófagos aderidos à placa foram mantidos nas condições descritas acima por 16 horas na presença de ácido araquídico (25 mM), ácido araquídico na presença do veículo ou do PBA (5,0 mM) e somente com veículo por 16 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

Citometria de fluxo

Ao final do período de 16 horas, na qual as condições experimentais foram: controle, na qual as células não foram expostas a qualquer tratamento; diluente, na qual as células foram expostas somente ao diluente; ácido araquídico na concentração final de 25 mM e ácido araquídico na presença de PBA na concentração de 5 mM; os macrófagos foram obtidos, centrifugados a 800 *rpm* por 10 minutos a 37°C e ressuspensos em tampão de PBS. As células foram incubadas com o anticorpo primário para marcação de F4/80 por 15 minutos, numa concentração final de 2,5 µg/mL, em seguida incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC na diluição final de 1:100. Para a marcação das proteínas p-JNK, p-PERK, p-eIF2α e GRP78, as células previamente a incubação com os respectivos anticorpos, foram fixadas em paraformaldeído 4 % e permeabilizadas com saponina 0,1 %. A análise de

expressão das proteínas descritas acima, foi feita por citometria de fluxo (10000 eventos/segundo), e a análise dos histogramas foi realizada com auxílio do software CellQuest (Becon-Dickinson, San Jose, CA, USA).

Avaliação de ingestão alimentar e variação de peso em camundongos mutantes de TLR4

Para avaliarmos os efeitos das diferentes dietas nos parâmetros metabólicos e inflamatórios, foram utilizados camundongos mutantes TLR4 C3H/HeJ e seu controle C3H/HeN. Os animais foram divididos em dois grupos com pesos similares (25 – 30 g), um grupo recebendo dieta controle (10 % do valor calórico de lipídios) e outro recebendo dieta hiperlipídica (59 % do valor calórico de lipídios) oferecidas *ad libitum*, assim como água por oito semanas. O peso e a ingestão alimentar foram avaliados na primeira e na última semana do período experimental.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Quando comparados dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados. Quando necessário, utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida de teste para comparação múltipla de médias. Foi adotado o nível de significância $p < 0.05$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization - Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva Switzerland: WHO; 2002
2. European Food Information Council Newsletter. Obesity the Disease of the Millennium. Foodtoday 1998;1.
3. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico de 1970. (1973) "VIII recenseamento geral do Brasil", série nacional, volume I. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
4. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002) "Tabulação avançada do censo demográfico 2000". Resultados preliminares da amostra. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
5. Monteiro CA, Conde W. A tendência secular da obesidade segundo estratos sociais: Nordeste e Sudeste do Brasil 1975-1989-1997. Arq Bras Endocrinol Metab 1999; 43:186-94.
6. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature 2000;404(6778):635-43.
7. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 1998;395(6704):763-70.
8. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell 2004;116(2):337-50.
9. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature 2000;404(6778):661-71.
10. Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. FEBS Lett 2001;500(3):119-24.
11. Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003;285(1):E216-23.
12. Carvalheira JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. Biol Chem 2003;384
13. McCowen KC, Malhotra A, Bistrian BR. Stress-induced hyperglycemia. Crit Care Clin 2001;17(1):107-24.
14. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. Int J Obes Relat Metab Disord 2003;27 Suppl 3:S53-5.

15. Keys A, Anderson JT, Grande F. Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet* 1957;273(7003):959-66.
16. Taubes G. Nutrition. The soft science of dietary fat. *Science* 2001;291(5513):2536-45.
17. USDA (U.S. Department of Agriculture). Food Guide Pyramid. Home and Garden Bulletin 252. August 1992.
18. U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans 2005. 6th ed. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, January 2005.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Ministério da Saúde 2005.
20. World Health Organization - Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO; 2003. 916. (WHO Technical Report Series)
21. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000;102(18):2284-99.
22. Ornish D. Low-fat diets. *N Engl J Med* 1998;338(2):127; author reply 128-9.
23. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146(10):4192-9.
24. Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 2008;15(3):189-93.
25. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503-29.
26. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004;47(2):170-84.
27. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 2008;283(21):14230-41.
28. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003;278(40):38105-8.

29. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
30. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21: 335-76.
31. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189(11):1777-82.
32. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13(7):933-40.
33. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):499-511.
34. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4(2):161-7.
35. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169(12):6668-72.
36. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56(8):1986-98.
37. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116(11):3015-25.
38. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306(5695):457-61.
39. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313(5790):1137-40.
40. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115(5):1111-9.
41. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444(7121):860-7.
42. Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Chae SW, Chae HJ. Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(1):140-5.

43. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 2004;145(11):5087-96.
44. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(6):411-21.
45. Ma Y, Hendershot LM. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 2001;107(7):827-30.
46. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000;287(5453):664-6.
47. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114(12):1752-61.
48. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440(7086):944-8.
49. Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 1980;3(2):129-49.
50. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939-51.
51. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177(2):751-66.
52. Velloso LA, Kampe O, Hallberg A, Christmanson L, Betsholtz C, Karlsson FA. Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 1993;91(5):2084-90.
53. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(22):12490-5.
54. Araujo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005;146(3):1428-37.

55. Hirota M, Kitagaki M, Itagaki H, Aiba S. Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress. *J Toxicol Sci* 2006;31(2):149-56.
56. Bertelli DF, Araujo EP, Cesquini M, Stoppa GR, Gasparotto-Contessotto M, Toyama MH, et al. Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 2006;147(11):5385-99.
57. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226(1):497-509.
58. Abushufa R, Reed P, Weinkove C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clin Chem* 1994;40(9):1707-12.
59. Nishiyama-Naruke A, Souza JA, Carnelos M, Curi R. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C. Analysis of fatty acids in oils and tissues. *Anal Lett* 1998; 31:3565-76.