

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

VAGNER RAMON RODRIGUES SILVA

OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A SENSIBILIDADE À GLICOSE NO
HIPOTÁLAMO DE RATOS: O PAPEL DA PROTEÍNA HIF2 ALFA

THE EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE ABOUT GLUCOSE SENSING IN THE
HYPOTHALAMUS OF RATS: THE ROLE OF HIF2 ALPHA

LIMEIRA

2018

VAGNER RAMON RODRIGUES SILVA

THE EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE ABOUT GLUCOSE SENSING IN THE
HYPOTHALAMUS OF RATS: THE ROLE OF HIF2 ALPHA

OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A SENSIBILIDADE À GLICOSE NO
HIPOTÁLAMO DE RATOS: O PAPEL DA PROTEÍNA HIF2 ALFA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de Doutor em Ciências da Nutrição e do
Esporte e Metabolismo na área de
Metabolismo e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

Este exemplar corresponde à versão final
dissertação/tese defendida pelo aluno Vagner
Ramon Rodrigues Silva e orientado pelo
professor Dr. Eduardo Rochete Ropelle

LIMEIRA

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/20052-5
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4793-107>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Si38e Silva, Vagner Ramon Rodrigues, 1985-
Os efeitos do exercício físico sobre a sensibilidade à glicose no hipotálamo de ratos : o papel da proteína HIF2 alfa / Vagner Ramon Rodrigues Silva. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Hipotálamo. 2. Glicose. 3. Consumo de alimentos. 4. Exercícios físicos. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The effects of physical exercise about the glucose sensing in the hypothalamus of rats : the role of HIF2 alpha

Palavras-chave em inglês:

Hypothalamus

Glucose

Food consumption

Physical exercises

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Eduardo Rochete Ropelle

Adelino Sánchez Ramos da Silva

Ellen Cristini de Freitas

Mario José Abdalla Saad

Licio Augusto Velloso

Data de defesa: 19-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Autor: Vagner Ramon Rodrigues Silva

Natureza: Trabalho de Defesa de Doutorado em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas (FCA/UNICAMP).

Aprovado em: 19/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle (Orientador) – Presidente da banca/ Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva (avaliador) / Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP-USP).

Profa. Dra. Ellen Cristini de Freitas (avaliador) / Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP-USP).

Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad (avaliador) / Faculdade de Ciências Médicas (FCM / UNICAMP).

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso (avaliador) / Faculdade de Ciências Médicas (FCM / UNICAMP).

*Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória

Dedico esta tese à minha querida mãe, Maria Dalva Rodrigues Silva. Uma verdadeira amiga e companheira para todos os momentos. Sem você nada disso seria possível.

Agradecimentos

À minha família, meu pai, João Pereira da Silva, e minha mãe, Maria Dalva Rodrigues da Silva, meus irmãos, Fabio Rodrigues da Silva e Deibson Rodrigues da Silva, meus sobrinhos, João Gabriel Rodrigues da Silva, Ana Clara Rodrigues da Silva, Felipe Steffen da Silva e Luiz Fernando Steffen da Silva, minhas cunhadas, Mayara de Paula e Cristiane Steffen, por todo apoio dado e por proporcionarem muitas alegrias durante esta jornada.

À minha namorada, Thais Fenz Araújo, pelas contribuições e discussões intelectuais, pela dedicação ao nosso relacionamento e pela paciência nesses anos todos de convivência durante meu doutorado.

Ao meu amigo professor Mestre Felipe Lovaglio Belozo, pelos longos diálogos sobre a vida, discussões acadêmicas, colaborações e principalmente pela amizade, um irmão que a vida me deu.

Aos meus amigos professor Dr. Carlos Kiyoshi Kathashima e mestre Luciene Lenhare, além de colaboradores, amigos que a vida me deu durante esta jornada acadêmica. Sou grato demais pela ajuda que vocês têm me dado até hoje.

Aos meus amigos professor Dr. Gustavo Duarte Pimentel e Mestre Thayana O. Michelette deixo meu muito obrigado por me ajudarem e me ensinarem no início de minha carreira, pelos anos de experimentos juntos e por terem me apoiado nesta jornada acadêmica. Aprendi muito com vocês.

Ao meu amigo Felipe Diogenes de Souza, pelos 26 anos de amizade sincera. Um grande irmão e parceiro.

Ao meu orientador professor Eduardo Rochete Ropelle, por ter aceitado me orientar desde o mestrado e por dar todo o suporte para que eu chegasse onde estou hoje na vida acadêmica. Serei sempre grato por esta oportunidade. Ainda me lembro do primeiro dia de nossa conversa, acho que ambos estávamos com medo.

Aos Professores Dennys Cintra, José Rodrigo Pauli e Leandro Pereira de Moura, por todo suporte científico e acadêmico, recebam meu muito obrigado.

Aos professores Mário Abdala Saad e Lício Augusto Velloso, agradeço pelo suporte financeiro e técnico, que foram fundamentais para a realização de diversas publicações científicas.

Aos técnicos, Senhores Luís Janeri (*in memória*) e Jósimo, por estarem sempre à disposição para me ajudar no laboratório, também agradeço pelos momentos de descontração e risadas proporcionadas pelo seu Jósimo.

À Sandra e Dioze, Técnicas laboratoriais, pelo suporte técnico e acadêmico, fica aqui meu muito obrigado.

À técnica do Cemib, Erica, obrigado por toda agilidade e dedicação e disposição para esclarecimentos.

Aos técnicos do núcleo, Marino, seu Zé, seu Antônio, pelos 6 anos de convívio. Sem vocês não tem ciência experimental. Deveriam ser mais valorizados. Muito obrigado pela dedicação e toda ajuda quando precisamos de vocês. MUITÍSSIMO obrigado, sem vocês eu não teria conseguido metade do que fiz na ciência.

A todos do laboratório de Biologia Molecular (Labmex), Sinalização Celular (LabSinCel), de Investigação Clínica de Resistência à Insulina (LICRI), pelo suporte técnico e discussões acadêmicas.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela ajuda financeira e comprometimento nos pagamentos de bolsa, que proporcionou o fechamento deste estudo e de minha formação acadêmica até o presente momento. Sem dúvida, uma das instituições que mais incentiva a ciência no mundo.

Por fim, meu muito obrigado a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que esta caminhada fosse capaz.

Resumo

Em mamíferos, a ingestão alimentar e o gasto energético são fortemente regulados por neurônios específicos localizados no hipotálamo. O hipotálamo realiza esse controle através de sinais hormonais e nutricionais advindos da periferia. Um dos principais sinais nutricionais relacionados ao controle da ingestão alimentar é a glicose. Estudos apontam que a perda seletiva de sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos está relacionada à hiperfagia e obesidade. Recentemente foi desvendado o papel da proteína HIF2 α como um importante regulador da sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos. A perda de função de HIF2 α reduz a capacidade de os neurônios detectarem a presença de glicose, resultando em aumento da ingestão alimentar e peso corporal em camundongos. Nesse contexto, o controle da expressão de HIF2 α nos neurônios pode ser considerado uma estratégia determinante para a manutenção do fenótipo magro. Estudos sugerem que o lactato, subproduto da via glicolítica, pode ser um modulador das HIFs. Paralelamente, evidências mostraram que o exercício físico, considerado um dos maiores contribuintes para o controle do peso corporal e gasto energético, é um potente indutor na produção de lactato. Desse modo, os objetivos deste estudo foram investigar os efeitos do exercício físico sobre a sensibilidade à glicose no hipotálamo de ratos e avaliar a expressão da proteína HIF2 α no hipotálamo. Inicialmente, ratos Wistar foram submetidos ao consumo de dieta padrão (do inglês standard chow diet /Chow) e/ou dieta rica em gordura (do inglês High Fat Diet / HFD) durante 12 semanas. Posteriormente, utilizamos o exercício físico agudo de natação para induzir aumento da lactacidemia, em seguida, foi realizada uma injeção aguda intracerebroventricular (ICV) de glicose ou lactato. Nossos resultados mostraram que o consumo de dieta HFD causou obesidade e perda de sensibilidade à glicose no hipotálamo em ratos quando comparado ao grupo controle. O exercício físico agudo melhorou a glicemia de jejum e o consumo alimentar de ratos obesos, acompanhado da melhora da sensibilidade à glicose. Também encontramos aumento de mRNA de HIF2 α no hipotálamo de ratos magros e obesos, bem como nos níveis séricos e centrais de lactato pós-exercício em ratos obesos. Finalmente, a infusão aguda ICV de lactato aumentou o conteúdo proteico de HIF2 α e reduziu o consumo alimentar em ratos magros e obesos. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a expressão de HIF2 α hipotalâmica foi mediada, em parte, pelo lactato e que o

exercício físico pode ser um alvo terapêutico não farmacológico para aumento da expressão da HIF2 α e aumento da sensibilidade à glicose no hipotálamo.

Abstract

In mammals, food intake and energy expenditure are regulated by specific neurons located in the hypothalamus. The hypothalamus controls food intake and energy expenditure through hormonal and nutritional signals coming from the periphery. One of the major nutrients related to the control of food intake is glucose. Studies have shown that the selective loss of sensitivity glucose in hypothalamic neurons is related to overeating and obesity. Recently, Hypoxia Inducible Factor-2 (HIF2 α protein) has emerged as an important regulator in the maintenance of glucose sensitivity and hypothalamic neurons. The loss of function of this molecule reduces the ability of neurons to detect the presence of glucose, resulting in increased food intake and body weight in mice. In this context, the maintenance of neuronal HIF2 α functions can be considered a key strategy for maintaining lean phenotype. At the same time, the exercise is considered a major contributor to the control of body weight and energy expenditure. However, the effects of exercise on glucose sensitivity in the central nervous system (CNS) remain unexploited. Thus, the aim of this study is to investigate the effect of exercise on glucose sensitivity in the hypothalamus of rats and evaluate the expression of neuronal HIF2 α protein and the effect of lactate treatment about the neuronal HIF2 α protein expression. First, Wistar rats were randomly separated into two groups: One group consumed standard Chow diet (Chow), while the other group consumed High-Fat Diet (HFD) for twelve weeks. Next, using the acute swimming protocol exercise for induction of lactatemia and after we performed an acute intracerebroventricular (ICV) injection of glucose or lactate into the hypothalamus. Here, we showed that HFD consume caused obesity and loss neuronal glucose sensing when compared at control group. Acute physical exercise improved fasting glucose and food consumption and ameliorate the neuronal glucose sensing in obese rats. The mRNA of HIF2 α in the hypothalamus was raised and also serum and central lactate post-exercise in obese rats. Finally, the injection ICV of lactate increased protein content of HIF2 α in the hypothalamus and reduced food intake in lean and obese rats. Taken together, our results suggest, at least in parts, that the HIF2 α in the hypothalamus is mediate by lactate after the acute exercise. In conclusion, hypothalamic HIF2 α can be a target against obesity by improvement of neuronal glucose sensing.

Lista de Figuras

Figura 1. Formação das proteínas HIFs.	22
Figura 2. Fatores que modulam a ingestão alimentar através da HIF	22
Figura 3. Ciclo de Cori.....	25
Figura 4. Representação gráfica do teste de Lactato Mínimo (TLM).....	34
Figura 5. Obesidade causa perda de sensibilidade à glicose no hipotálamo.	39
Figura 6. Exercício físico melhora a sensibilidade à glicose em hipotálamo de ratos obesos.....	40
Figura 7. Exercício físico aumenta a expressão de HIF hipotalâmica em ratos	41
Figura 8. O exercício físico agudo aumenta a produção de lactato sérico e central em ratos.	42
Figura 9. O lactato aumenta o conteúdo proteico de HIF2 α <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	43
Figura 10. Consumo alimentar após tratamento ICV de Lactato e toxicidade no hipotálamo de ratos	44
Figura 11. Injeção aguda de lactato aumenta o conteúdo proteico de HIF2 α hipotalâmica e reduz o consumo alimentar em ratos obesos	44
Figura 12. Modelo esquemático sobre o efeito do exercício físico na modulação na expressão de HIF2 α no hipotálamo, através da indução na produção de lactato, melhorando a sensibilidade à glicose no hipotálamo.	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição centesimal de dieta padrão e dieta rica em gordura.....	35
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ICV	Intracerebroventricular
HIFα	Fator Induzível por Hipóxia alfa
HIFβ	Fator Induzível por Hipóxia beta
IMC	Índice de Massa Corporal
SNC	Sistema Nervoso Central
ARNT	Translocador Nuclear de Receptores de Hidrocarbonetos Aromáticos
POMC	Pro-opiomelanocortina
CART	Regulador de transcrição Cocaina-e-Amfetamina
NPY	Neuropeptídeo Y
AgRP	Peptídeo Agouti-Related
PHD	Propil Hidroxilase
E3 ligase	Ubiquitina E3 ligase
VHL	Hippel-Lindau
AMPK	Proteína Quinase ativada por AMP
mTOR	Alvo mamífero da Rapamicina
ATP	Adenosina Trifosfato
AMP	Proteína monofosfato de Adenosina
Acetil	Acetilcoenzima A
LDH	Lactato desidrogenase
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
MCT	Transportador de Monocarboxilase
UCP1	Proteína desacoplada 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase 1B
S1P	Esfingonina 1 fosfato
S1PR1	Receptor 1 da esfingonina 1 fosfato
TGFβ	Fator de Crescimento Transformador Beta
INOS	NO-sintase induzível
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SFB	Soro fetal bovino

BCA	Ácido bicinchonínico
CHOW	Dieta Padrão
ipGTT	Teste de tolerância à glicose
TLM	Teste de lactato mínimo
iLM	Intensidade do lactato mínimo
TCA	Ácido tricloroacético
CSF	Fluido cérebro espinhal
GLUT1	Transportador de Glicose 1
GLUT2	Transportador de Glicose 2
mRNA	RNA mensageiro
FCS	Fluido cerebrospinal
HFD	Dieta Rica em Gordura
GPR81	Receptor 81 acoplado a proteína G
GAPDH	Gliceraldeído fosfato 3 desidrogenase

Sumário

1. Introdução	18
1.1 Obesidade.....	18
1.2 O hipotálamo no controle da homeostase energética	19
1.3 O papel das proteínas HIFs na sensibilidade à glicose.....	20
1.4 Metabolismo da glicose e expressão de HIFs	23
1.5 Produção de lactato e suas funções metabólicas	23
1.5.1 Produção periférica de lactato	24
1.5.2 Produção central de lactato	26
1.6 Modulação das funções hipotalâmicas em resposta ao exercício físico	27
2. Hipótese.....	29
3. Objetivos	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. Materiais e Métodos.....	31
4.1 Cultura de células	31
4.2 Tratamento das células GT1-7 com lactato e extração de proteínas	31
4.3 Extração de RNA e quantificação por RT-PCR real time	31
4.4 Animais e Dietas	31
4.5 Dietas.....	32
4.6 Teste de tolerância à glicose (ipGTT) e glicemia de jejum.....	32
4.7 Protocolo de exercício físico de natação aguda.....	33
4.8 Análise de lactato	34
4.9 Canulação intracerebroventricular (ICV)	34
4.10 Injeção Intracerebroventricular (ICV) de lactato e glicose	35
4.11 Avaliação da ingestão alimentar.....	35
4.12 Anticorpos e técnicas de Western blot e produtos químicos	36
4.13 Extração de tecidos.....	36
4.14 Análises estatísticas.....	37
5. Resultados	38
5.1 Obesidade reduz sensibilidade à glicose no hipotálamo.....	38

5.2 Exercício físico aumenta sensibilidade á glicose em hipotálamo de ratos obesos.	39
5.3 Exercício físico aumenta os níveis de HIF em hipotálamo de ratos magros e obesos	40
5.4 Exercício físico aumenta os níveis periféricos e centrais de lactato em ratos...	41
5.5 Injeção intracerebroventricular (ICV) de lactato aumenta a expressão da HIF no hipotálamo e reduz a ingestão alimentar em ratos magro	42
5.6 Avaliação da toxicidade da injeção ICV de lactato em ratos magros	43
5.7 Injeção ICV de lactato aumenta a expressão da HIF no hipotálamo e reduz a ingestão alimentar em ratos obesos	44
6. Discussão	46
Considerações finais	48
7. Conclusão	49
8. Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

1.1 Obesidade

A obesidade é definida como um índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30 kg por m², resultante do acúmulo de adiposidade devido ao excesso de consumo alimentar e armazenamento de calorias, comprometendo a homeostase energética (Pan and Myers, 2018), ou seja, é o desequilíbrio entre o consumo alimentar e o gasto energético.

Considerada uma das doenças de maior prevalência no mundo nos últimos tempos, a obesidade é descrita hoje como uma epidemia global (Kopelman, 2000) que atinge todas as classes sociais. Dados recentes mostraram que no Brasil, o índice de obesidade vem crescendo a cada ano. Uma pesquisa feita em 2016 pelo ministério da saúde revelou que a obesidade cresceu 60% em dez anos, passando de 11,8% para 18,9% em 2016, sendo esta prevalência duplicada a partir dos 25 anos de idade (PortalBrasil,Ministériodasaúde.Disponívelem:<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/04/obesidade-cresce-60-em-dez-anos-no-brasil>).

As consequências da obesidade são diversas, sendo o diabetes, doenças cardiovasculares e o câncer, as comorbidades que mais geram gastos aos órgãos públicos. No Brasil, no ano de 2016, foram destinados mais de 1,08 bilhão para os municípios realizarem a compra de remédios de atenção básica, como os para tratamento de pressão arterial e diabetes (Portal Brasil, Ministério da saúde. Disponível em:<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/04/obesidade-cresce-60-em-dez-anos-no-brasil>). Além de estar relacionado a essas comorbidades, o excesso de peso está diretamente relacionado à menor sobrevida (Berrington de Gonzalez et al., 2010; Organization, 2017).

Há décadas centros de pesquisas tentam descobrir estratégias para manutenção do peso corporal através de explorações farmacológicas e/ou tratamentos terapêuticos relacionados ao comportamento alimentar. Neste sentido, encontrar alternativas para controlar o consumo alimentar e, conseqüentemente, a manutenção do peso corporal é extremamente relevante para a saúde pública.

1.2 O hipotálamo no controle da homeostase energética

O hipotálamo é reconhecido como a principal estrutura anatômica do sistema nervoso central (SNC), sendo considerado o centro integrador das atividades dos órgãos viscerais, além de regular outras funções orgânicas importantes, como por exemplo; o controle da ingestão alimentar, da temperatura corporal, da sede, da pressão arterial, e do gasto energético (Schwartz et al., 2000).

O controle da homeostase energética mediado pelo hipotálamo ocorre devido à presença de neurônios específicos localizados em diferentes núcleos hipotalâmicos. Esses neurônios são capazes de integrar sinais hormonais (insulina, leptina, grelina) e nutricionais (glicose, aminoácidos e ácidos graxos) (Kahn et al., 2005; Lam, 2010; Porte et al., 2005; Schwartz and Porte, 2005; Schwartz et al., 2000), promovendo uma complexa rede de disparos neuronais, resultando em aumento ou diminuição da termogênese e da ingestão alimentar. Nesse contexto, os neurônios produtores de pro-opiomelanocortina (POMC) ganharam destaque pelo seu potente efeito anorexigênico, induzido tanto por hormônios (leptina) como por nutrientes (glicose e aminoácidos) (Blouet et al., 2009; Blouet et al., 2008; Ibrahim et al., 2003; Parton et al., 2007; Zhang et al., 2011).

Nos últimos anos, um extenso acumulado de evidências demonstrou que a redução da capacidade dos neurônios hipotalâmicos em reconhecer os sinais de saciedade mediados por hormônios e por nutrientes, resulta em hiperfagia e obesidade, no entanto, estes mecanismos são complexos (Blouet et al., 2009; Blouet et al., 2008; Kaelin and Ratcliffe, 2008; Scheerer et al., 2013; Semenza, 2003; van de Sande-Lee et al., 2011; Zhang et al., 2011). Estudos têm demonstrado que a perda da sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos é determinante para o aumento da ingestão alimentar e do peso corporal em modelos experimentais (Haque et al., 1999; Minokoshi et al., 2004; Parton et al., 2007; Shiuchi et al., 2009; Zhang et al., 2011). Pacientes obesos apresentam menor estimulação neuronal em regiões do sistema nervoso central após a ingestão de glicose, indicando uma evidente perda da sensibilidade à glicose em centros controladores da fome e do gasto energético, incluindo o hipotálamo (van de Sande-Lee et al., 2011). Após serem submetidos à cirurgia bariátrica e terem uma perda abrupta de gordura corporal, esses mesmos

pacientes recuperaram, ainda que parcialmente, a sensibilidade à glicose (van de Sande-Lee et al., 2011).

Esses dados sugerem que a adiposidade pode interferir diretamente nos sinais de saciedade, em especial sobre a sensibilidade à glicose hipotalâmica. Neste sentido, torna-se importante determinar os mecanismos pelos quais os neurônios tornam-se insensíveis aos nutrientes, especialmente à glicose.

1.3 O papel das proteínas HIFs na sensibilidade à glicose

As proteínas HIFs (do inglês *Hypoxia Inducible Factor*), constituem uma família de proteínas que atuam como fatores de transcrição. Essas proteínas, além de serem induzidas em condições de hipóxia (baixa concentração de oxigênio no sangue), são induzidas pela elevação de temperatura tecidual, alterações energéticas do metabolismo celular e diversos outros estados patológicos como câncer, aterosclerose e isquemias (Noakes, 2009). Recentes estudos têm mostrado que, além dos níveis de oxigênio, o controle da expressão das HIFs pode ocorrer através da concentração da insulina e da glicose (Parton et al., 2007; Zhang et al., 2011).

As HIFs são formadas por dímeros compostos pelas subunidades alfa (α) e beta (β). A HIF α é classicamente regulada pela disponibilidade de oxigênio nos tecidos, enquanto a HIF β , também chamada de ARNT (do inglês, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), possui mecanismos de ativação alternativos. Em estado de normóxia, as HIFs α sofrem hidroxilação proteica, ubiquitinação e degradação, sendo esses processos mediados pela hidroxilase prolil (PHD) e pela ubiquitina E3 ligase pVHL, produto do gene Hippel-Lindau (VHL) (**Figura 1**) (Kaelin and Ratcliffe, 2008; Semenza, 2003). Em estado de hipóxia a PHD é reduzida, levando à estabilização das HIFs α e ação transcricional das HIFs α/β , as quais induzem genes reguladores de adaptações metabólicas, crescimento vascular e sobrevivência celular (Kaelin and Ratcliffe, 2008; Semenza, 2003). Dentre as diversas isoformas, HIF1 α , HIF2 α e HIF3 α , são as mais conhecidas. As duas primeiras atualmente estão em evidência por estimularem a captação de glicose no sistema nervoso central. No entanto, os achados sobre estas moléculas no hipotálamo ainda são modestos (Virtue and Vidal-Puig, 2011).

Como mencionado anteriormente, no sistema nervoso central, o controle da fome é mediado por neurônios hipotalâmicos anorexigênicos, POMC e CART (do inglês *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript*), inibem a fome e neurônios hipotalâmicos orexigênicos NPY (do inglês *Neuropeptide Y*) e AgRP (do inglês *Agouti-related peptide*), estimulam a fome). Recentemente foi demonstrado que a modulação de neurônios POMC é dependente da expressão de proteínas HIF1 α e HIF2 α (Varela et al., 2017; Zhang et al., 2011). Em camundongos, o silenciamento de HIF1 α interrompeu a habilidade dos neurônios POMC em se adaptarem a condições metabólicas após o jejum prolongado. De maneira interessante, isto foi revertido quando os animais foram tratados com glicose (Varela et al., 2017). Ademais, a deleção específica da HIF2 α em neurônios POMC resultou em perda de sensibilidade à glicose, hiperfagia e ganho de peso em camundongos, demonstrando a HIF2 α controla diretamente a expressão de POMC em núcleos hipotalâmicos (Zhang et al., 2011).

A HIF2 α também é capaz de modular a via AMPK/mTOR neuronal (AMPK, do inglês *5' AMP-activated protein kinase*) (mTOR do inglês *mammalian target of rapamycin*), tornando sua ação anorexigênica ainda mais robusta, inibindo a fosforilação em treonina 172 da AMPK e estimulando a atividade da mTOR. O mecanismo através do qual a glicose estimula a atividade anorexigênica da HIF2 α ocorre através da degradação da hidroxilases prolil (PHD), resultando em acúmulo de HIF2 α . Postula-se que a inibição da PHDs possa ser dependente dos subprodutos da glicólise (piruvato e lactato) e de moléculas intermediárias do ciclo de Krebs (malato, fumarato, succinato e oxalacetato) (Virtue and Vidal-Puig, 2011; Zhang et al., 2011) **(Figura 2)**.

Coletivamente, esses dados sugerem que a proteína HIF2 α pode ser alvo terapêutico no controle da ingestão alimentar e do peso corporal (Zhang et al., 2011), uma vez que ela atua na regulação da sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos, modulando a capacidade destes em reconhecer os sinais de saciedade (Compernelle et al., 2002; Kaelin and Ratcliffe, 2008; Scheerer et al., 2013; Semenza, 2003; van de Sande-Lee et al., 2011; Zhang et al., 2011).

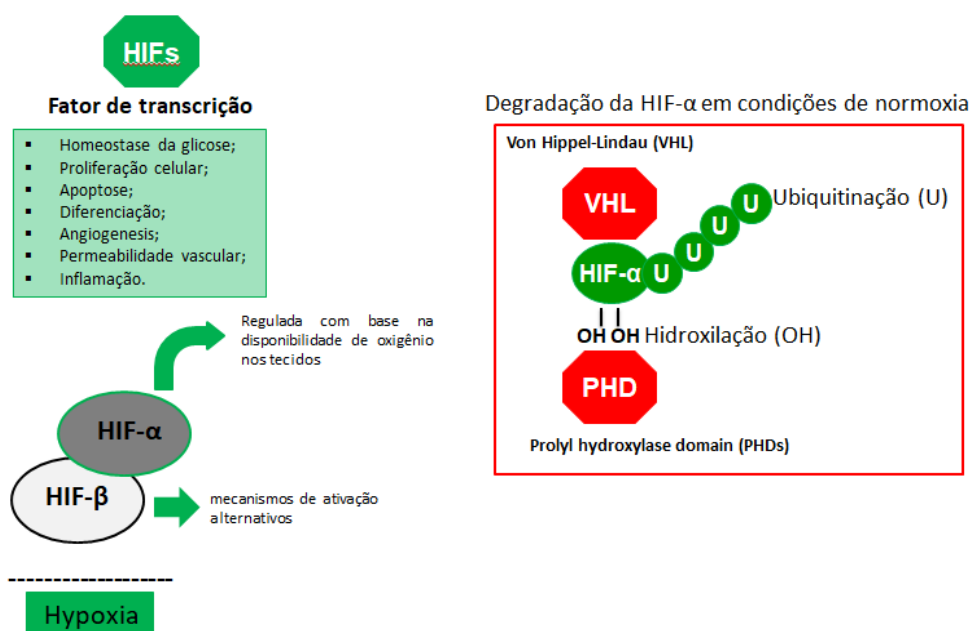


Figura 1. Formação das proteínas HIFs. As proteínas HIFs, compostas pelas subunidades alfa(α), são reguladas pela disponibilidade de oxigênio nos tecidos, enquanto as subunidades beta (β) possuem mecanismos alternativos de regulação. Em condições de hipóxia (baixas concentrações de oxigênio) as PHDs e E3 ligases são reduzidas a expressão, estabilizando as HIF α . Por outro lado, em estado de normoxia (condições normais de oxigênio), as HIF α podem ser hidroxiladas pelas proteínas hidroxilase proil (PHDs), ou ubiquitinadas pelas ubiquitina E3 ligase pVHL, produto do gene Hippel-Lindau (VHL).

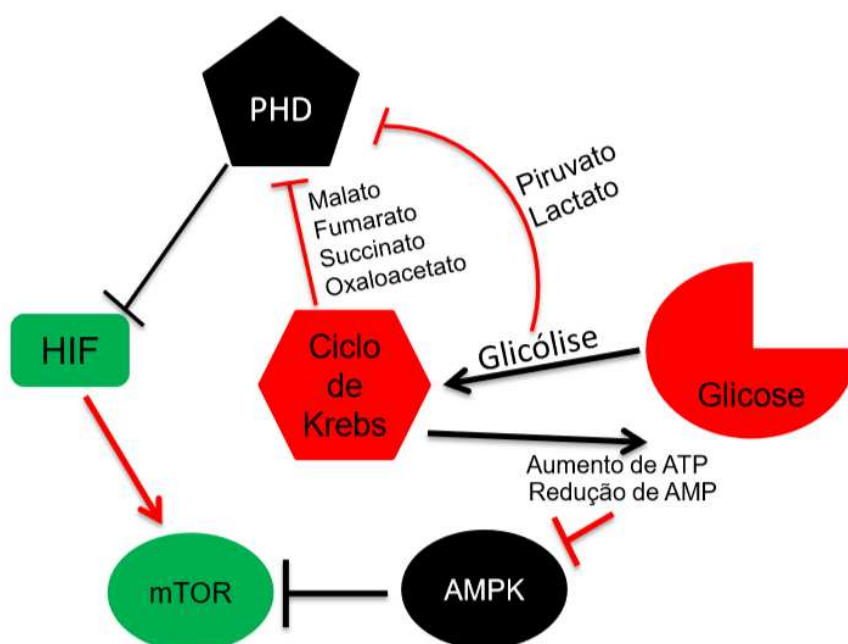


Figura 2. Fatores que modulam a ingestão alimentar através da HIF no hipotálamo. A via glicolítica aumenta a produção de piruvato/lactato e/ou os subprodutos do ciclo de Krebs (Malato, Fumarato, Succinato e Oxaloacetato), estes,

inibem a expressão da proteína PHD, a PHD possui a função de degradar a HIF pelo processo de hidroxilação, quando a PHD permanece inativa, a HIF é estabilizada transcrevendo genes para proteína mTOR aumentando sua atividade que por sua vez irá aumentar a expressão de neuropeptídeo anorexigênicos (redução a fome). Além disso, a via glicolítica inibe a atividade de AMPK pelo aumento de ATP (Adenosina trifosfato) e diminuição de AMP (proteína adenosina monofosfato). A proteína AMPK tem capacidade de inibir a atividade de mTOR culminando consequentemente ao aumento do consumo alimentar.

1.4 Metabolismo da glicose e expressão de HIFs

A inibição da hidroxilase proil (PHDs), proteína reguladora de HIFs, parece ser dependente dos subprodutos da glicólise (piruvato e lactato) e de moléculas intermediárias do ciclo de Krebs (malato, fumarato, succinato e oxalacetato) (Virtue and Vidal-Puig, 2011; Zhang et al., 2011). Estudos apontam que HIF1 α (Parton et al., 2007) e HIF2 α (Zhang et al., 2011) atuam na modulação de glicose em neurônios hipotalâmicos. A expressão de HIF2 α foi aumentada em tecidos hipotalâmicos após administração Intracerebroventricular (ICV) de glicose (Zhang et al., 2011), enquanto o tratamento com insulina *in vitro* foi capaz de aumentar os níveis de HIF1 α (Demidenko and Blagosklonny, 2011). No entanto, altas concentrações de glicose podem desestabilizar a expressão de HIFs em órgãos e tecidos (Bento and Pereira, 2011).

Embora alguns estudos relatem que o metabolismo da glicose (piruvato e lactato) pode estabilizar as proteínas HIFs, pouco se sabe sobre estes efeitos no sistema nervoso central ou no hipotálamo. De acordo com as evidências citadas acima, postulamos que o lactato, subproduto da glicólise, pode ser um potencial estimulador da expressão de HIF2 α neuronal, melhorando assim, a sensibilidade à glicose hipotalâmica de ratos obesos.

1.5 Produção de lactato e suas funções metabólicas

Apesar das inúmeras investigações do efeito do lactato no metabolismo energético, as conclusões ainda são modestas, devido à complexidade das vias em que este atua. Sendo necessários estudos adicionais para a melhor compreensão de sua finalidade e vias de atuação no organismo.

Por muitos anos o lactato foi considerado um simples produto final na via de glicólise. No entanto, estudos recentes mostram que ele pode ser um potente sinalizador em

diferentes tipos celulares, atuando de maneira endócrina, parácrina e autócrina, na modulação de processos metabólicos (Ahmed et al., 2010; Brooks, 2009; Gladden, 2008; Proia et al., 2016).

1.5.1 Produção periférica de lactato

No citoplasma, o piruvato, produto final da quebra da glicose, entra na mitocôndria onde é convertido em acetil-CoA (acetilcoenzima A). Após uma série de reações químicas, que em conjunto são denominadas de ciclo de Krebs, o acetil-CoA é oxidado, resultando na produção de ATP, que fornecerá energia para a célula. Em situações de alta demanda energética, como por exemplo, na contração muscular durante exercício físico de alta intensidade, as vias aeróbias não são rápidas e efetivas o suficiente para atender as necessidades metabólicas da célula, assim, reações bioquímicas anaeróbias são ativadas, gerando a produção de lactato. A conversão de glicose em lactato nos tecidos musculares ocorre através da transformação de piruvato e lactato por ação da enzima lactato desidrogenase (LDH), que é capaz de reciclar NAD⁺ (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*) para que ocorram novas reações (Chatham, 2002; Proia et al., 2016).

Quando produzido pela contração muscular, durante o exercício físico, o lactato é liberado na corrente sanguínea, atingindo o fígado, o coração e também o cérebro (Proia et al., 2016). De forma interessante, o lactato advindo da periferia pode atravessar a barreira hemato-encefálica, com ajuda dos transportadores de lactato (MCTs, do inglês, *Monocarboxylate transporters*) e agir no sistema nervoso central (Bergersen, 2007; Dalsgaard et al., 2004; Ide et al., 2000; Proia et al., 2016; van Hall et al., 2009).

Curiosamente, a administração periférica de lactato foi usada para tratar depressão em ratos (Carrard et al., 2016) e recentemente, estudos demonstraram que o lactato produzido pela contração muscular, através do exercício físico intenso, é utilizado como fonte de energia no sistema nervoso central (Bergersen, 2007; Dalsgaard et al., 2004; Ide et al., 2000; van Hall et al., 2009).

No fígado, o lactato pode ser convertido em glicose, em um processo inverso ao da glicólise, chamado de gliconeogênese. Parte do lactato produzido pelo músculo é transportada para o fígado, onde será transformada em glicose, que por sua vez será

liberada na corrente sanguínea, sendo reutilizada pelo músculo. Essa cooperação metabólica entre fígado e músculo é denominada ciclo de cori (Chatham, 2002). **(Figura 3).**

O coração, órgão capaz de usar vários substratos energéticos (glicose, ácidos graxos, corpos cetônicos), utiliza também lactato e o piruvato como fonte de energia. A absorção de lactato pelo coração é diretamente proporcional aos seus níveis séricos. Ao longo dos anos, pesquisas demonstraram que o lactato contribui muito mais do que a glicose para produção de acetil-CoA (Chatham, 2002). Em repouso, as concentrações de lactato são em média 1 mmol e, durante o exercício físico, aumenta para 3-5 mmol (Chatham, 2002). Recentemente, foi demonstrado que a exposição ao frio pode aumentar os níveis circulantes de lactato e de MCTs, aumentando a expressão de UCP1 (do inglês, *uncoupling protein 1*), proteína responsável pela termogênese no tecido adiposo marrom (Carrière et al., 2014).

O lactato também pode ser produzido pelos adipócitos. Para neutralizar a falta de oxigênio (hipóxia) causada pelo excesso de gordura e evitar a diminuição drástica do pH intracelular, os adipócitos utilizam o metabolismo glicolítico. Durante o processo, os prótons são removidos das células pelos MCTs. A produção de lactato é proporcional a massa corpórea, ou seja, o excesso de peso estimula a produção de lactato (Chen et al., 2017; Pérez de Heredia et al., 2010).

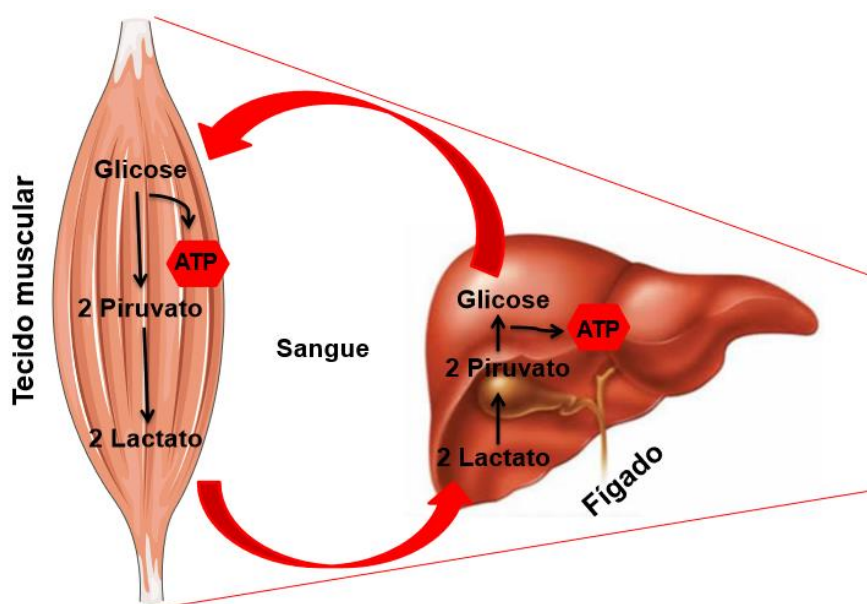


Figura 3. Ciclo de Cori. Conversão de lactato em glicose. Em condições anaeróbicas, o músculo oxida glicose até lactato através de reações bioquímicas (piruvato- lactato).

Quando os estoques de glicose no músculo encontram-se baixos, o lactato (produto final da glicose anaerobia) cai na corrente sanguínea chegando ao fígado. No fígado, o lactato será convertido em piruvato novamente sintetizando glicose processo este chamado de gliconeogenese. Por fim, a glicose será direcionada novamente para a corrente sanguínea chegando ao músculo para ser utilizada como fonte energética.

1.5.2 Produção central de lactato

O lactato não é produzido somente em tecidos periféricos, mas também no sistema nervoso central. Um tipo específico de célula da glia, os tanicitos, que revestem as paredes do terceiro ventrículo do hipotálamo, produzem e liberam lactato através dos MCTs em resposta a altas concentrações de glicose (Ainscow et al., 2002; Cortes-Campos et al., 2013; Cortés-Campos et al., 2011; Elizondo-Vega et al., 2015; García et al., 2003; Millán et al., 2010; Orellana et al., 2012; Thorens, 2012).

Os tanicitos possuem formato alongado e são capazes de entrar em contato com o fluido cérebro espinal. Em condições fisiológicas normais, os níveis de lactato no cérebro são de aproximadamente 1.5-5mmol/g, (0.1-1.4 mmol/L em níveis extracelulares) e, em condições suprafisiológicas, chega a 12-20mmol/g (1.9-9 mmol/L em níveis extracelulares) (Mosienko et al., 2015). Evidências apontam que tratamento intracerebroventricular (ICV) com lactato ou piruvato é capaz de reduzir a ingestão alimentar e o peso corporal de ratos (Lam et al., 2008; Lam et al., 2005).

Recentemente foi descrito que o lactato possui um receptor específico, o GPR81 (do inglês *G protein-coupled receptor 8*) (Wanders et al., 2012), no entanto, os MCT1-4 são os principais carregadores de lactato no sistema nervoso central, sendo o MCT1, MCT2 e MCT4 responsáveis pelas sinalizações em núcleos hipotalâmicos. O silenciamento de MCT1 no hipotálamo aumentou a ingestão alimentar e alterou neuropeptídeos anorexígenos e orexígenos (Elizondo-Vega et al., 2016). O mesmo foi visto com os MCT2 e MCT4 (Cortes-Campos et al., 2013). Em paralelo, o exercício físico agudo aumentou a produção de lactato e dos transportadores MCT1, MCT2 e MCT4 no hipotálamo de ratos (Takimoto and Hamada, 2014). Assim, parece que a expressão dos MCTs no hipotálamo tem funções fundamentais na homeostase energética bem como o controle da fome em mamíferos. Entretanto, ainda são inconclusivos os efeitos dos MCTs no hipotálamo.

Em resumo, de acordo com a literatura, parece que o lactato pode ser produzido na periferia e atravessar a barreira hemato-encefálica através dos MCTs ou ser produzido de maneira central pelas células da glia e ser liberados no fluido cérebro espinal, atingindo toda região do cérebro.

1.6 Modulação das funções hipotalâmicas em resposta ao exercício físico

O exercício físico é reconhecido como uma ótima estratégia terapêutica não-farmacológica a ser utilizada para prevenção e tratamento de diversas doenças incluindo a obesidade (Febbraio, 2017; Pedersen and Saltin, 2015). Além de seus efeitos sobre o metabolismo periférico, estudos apontam que o exercício é capaz de modular a homeostase energética através de efeitos centrais.

Já foi demonstrado que o exercício físico de natação reduziu a concentração de glicose e aumentou a concentração de lactato em hipotálamo de ratos (Wang et al., 2002; Wang et al., 2009). Além disso, o exercício físico em esteira promoveu degradação robusta dos níveis de glicogênio no cérebro de ratos (Matsui et al., 2012).

Alguns estudos feitos em nosso laboratório evidenciaram os efeitos do exercício físico sobre as funções hipotalâmicas relacionadas ao controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Em 2010, Ropelle e colaboradores mostraram que o exercício físico aeróbio também é capaz de restabelecer os sinais anorexigênicos da insulina e da leptina no hipotálamo de roedores obesos, contribuindo para a redução da ingestão alimentar e do peso corporal, através de um mecanismo anti-inflamatório que envolve o aumento da expressão sistêmica e localizada das citocinas IL-6 (do inglês *Interleukin 6*) e IL-10 (do inglês *Interleukin 10*) (Ropelle et al., 2010).

Foi observado que o eixo IL6/IL10 é determinante para a redução de vias inflamatórias e redução do estresse de retículo endoplasmático em neurônios hipotalâmicos (Ropelle et al., 2010). Adicionalmente, descrevemos que a IL-6 produzida pelo exercício, promove supressão da expressão e da atividade da Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B) em hipotálamo de ratos obesos, recuperando significativamente a sensibilidade à insulina e leptina neste tecido, uma vez que a PTP1B é considerada molécula chave na resistência central à insulina e leptina (Chiarreotto-Ropelle et al., 2013). Esses resultados sugerem que a contração muscular promovida pelo exercício sensibiliza o hipotálamo através destas citocinas,

estabelecendo uma intrigante conexão entre esses tecidos, mudando o entendimento do exercício físico como estratégia de controle da homeostase energética, conforme descrito em diferentes destaques editoriais (Martínez de Morentin and López, 2010; Welberg, 2010).

Recentemente mostramos que a sinalização do eixo S1P/S1PR1 (do inglês *Sphingosine 1 phosphate / Sphingosine 1 phosphate receptor 1*) em neurônios hipotalâmicos regulou a homeostase energética em ratos. A falha de sinalização do receptor S1PR1 foi encontrada em diversos modelos de obesidade. Por outro lado, a ativação do receptor S1PR1 de maneira farmacológica preveniu ratos obesos contra obesidade (Silva et al., 2014). Adicionalmente, observamos que o exercício pode aumentar a expressão do receptor S1PR1 e reduzir o consumo alimentar em roedores (Silva et al., 2016).

Em 2017, observamos que o exercício físico agudo e crônico reduziu níveis inflamatórios de TGF β (do inglês *Transforming Growth Factor Beta*), proteína responsável pela perda da saciedade, além de reduzir os níveis de neurônios NPY no hipotálamo de ratos, recuperando a saciedade (Silva et al., 2017). Também observamos que o exercício agudo reduziu a S-nitrosação, esta induzida pelo NO-sintase induzível (iNOS) que aumenta resistência a insulina associado a obesidade, na sinalização da via de insulina no hipotálamo de roedores (Katashima et al., 2017). Esses dados sugerem que o exercício físico é capaz de sensibilizar diferentes vias anorexigênicas no hipotálamo.

Coletivamente, esses dados sugerem que o exercício é capaz de modular o metabolismo da glicose no sistema nervoso central, no entanto, os efeitos do exercício físico sobre a sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos ainda são poucos conhecidos.

2. Hipótese

O exercício físico agudo atua modulando a expressão de HIF2 α hipotalâmica e consequentemente aumentando a sensibilidade à glicose no hipotálamo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos o exercício físico agudo sobre a expressão de HIF2 α hipotalâmica, bem como na sensibilidade à glicose no hipotálamo de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão de HIF2 α hipotalâmica e o comportamento alimentar de ratos magros e obesos submetidos ao exercício físico agudo;
- Verificar a expressão de HIF2 α hipotalâmica submetidos a uma sessão aguda de exercício físico;
- Examinar a sensibilidade à glicose neuronal e o comportamento alimentar de ratos obesos submetidos ao exercício agudo e infusão intracerebroventricular (ICV) de glicose;
- Analisar os efeitos da injeção de lactato intracerebroventricular (ICV) na expressão de HIF2 α hipotalâmica e no comportamento alimentar de ratos magros e obesos;
- Verificar a expressão de HIF2 α em células hipotalâmicas após o tratamento com lactato.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células

As células GT1-7 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 10 % de SFB (soro fetal bovino) a 37°C, sob atmosfera de 5 % de CO₂.

4.2 Tratamento das células GT1-7 com lactato e extração de proteínas

As células GT1-7 foram plaqueadas na concentração de 3×10^5 células/poço em e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 16 horas. Após esse período, as células foram tratadas com lactato (Sigma®), na concentração de 5 mM, diluído em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, por períodos de 8, 16, 24 e 48 horas. As células GT1-7 foram então lavadas com PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e lisadas com tampão de lise celular (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Triton 1 % e inibidores de protease e fosfatase 1X (Sigma-Aldrich®)). Os fragmentos foram incubados por 15 minutos em gelo sob agitação e centrifugados a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método do ácido bicinchoninico (BCA), utilizando o kit *BCA Protein Assays* (Thermo Fisher Scientific®), para posterior diluição das amostras.

4.3 Extração de RNA e quantificação por RT-PCR real time

O RNA total foi extraído usando o reagente TRIZOL (Sigma-Adrich Co LTD) e a transcrição reversa foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O PCR real time foi conduzido utilizando-se o kit *taqman* (para ratos) para expressão gênica de: *Hif1α*, *Hif2α*, *Glut1* (glucose transporter 1), *Glut2* (glucose transporter 2), *AgRP*, *Npy*, *Pomc*, *Cart* e *Gapdh* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Os dados da expressão de genes alvo obtidos foram corrigidos na média geométrica dos genes com controle endógeno, usando o *Gapdh*. Os primers utilizados foram adquiridos pela empresa Síntese Biotecnologia / Distribuidora Roche.

4.4 Animais e Dietas

Foram utilizados ratos albinos machos da linhagem Wistar, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de

Laboratório – CEMIB/UNICAMP, os quais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/UNICAMP. Os animais foram alimentados com ração, dieta padrão Chow (3.948 kcal.kg⁻¹) para roedores e água *ad libitum* e alojados em quintetos em gaiolas de polipropileno, em ambiente climatizado (22± 2°C, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, iluminação em ciclo claro/escuro 12/12h, com luz acesa das 6 às 18h). Com o intuito de respeitar o período de vigília dos animais, todos os procedimentos experimentais foram realizados após as 18h, quando as luzes do biotério estavam apagadas. Durante a manipulação noturna dos animais foram acesas lâmpadas com filtro vermelho e corte espectral em 600nm, com luminosidade controlada abaixo de 70 lux, a fim de reduzir a percepção dos animais à luz e possibilitar a visibilidade dos pesquisadores. Os experimentos foram conduzidos rigorosamente de acordo com a legislação brasileira corrente e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Esse estudo foi previamente aprovado por uma Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA (protocolo nº 3244-1).

4.5 Dietas

Para a indução da obesidade, ratos Wistar consumiram dieta hiperlipídica (HFD) (5358 Kcal/Kg) (**Tabela 1**) à base de gordura saturada durante 12 semanas, enquanto o respectivo grupo controle manteve dieta padrão (Chow) conforme descrito na literatura (Silva et al., 2014).

4.6 Teste de tolerância à glicose (ipGTT) e glicemia de jejum

Para o teste de ipGTT, os ratos permaneceram em jejum durante 12 horas, em seguida, foi injetado uma solução de glicose 50% na medida de 2g/kg do peso corporal do animal. Os níveis séricos de glicose foram mensurados antes (tempo 0) e 15,30,60 e 120 minutos após a injeção de glicose usando tiras de leitura de glicose (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic ®, Switzerland). A leitura foi feita através do sangue coletado pela cauda do animal.

Para glicemia de jejum, os animais permaneceram em jejum durante 6 horas, em seguida foi coletado o sangue da cauda e feita a leitura imediatamente após, com tiras de leitura de glicose (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostic ®, Switzerland). O grupo exercitado foi submetido ao exercício agudo e, em seguida, os animais

permaneceram 6 horas de jejum, todos os grupos foram coletados no mesmo momento.

4.7 Protocolo de exercício físico de natação aguda

Adaptação ao meio líquido:

A adaptação ao meio líquido ocorreu no período de 14 dias ininterruptos, a temperatura da água foi mantida a $33\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os procedimentos de adaptação ao meio líquido aplicados aos grupos experimentais foram similares até o 8º dia. Inicialmente, os ratos foram inseridos em água rasa por curto período de tempo e, subsequentemente, acréscimos na duração do estímulo e profundidade da água foram efetuados.

Teste de lactato mínimo (TLM):

A intensidade do lactato mínimo (iLM) foi utilizada como parâmetro individualizado de capacidade aeróbia e o tempo até exaustão durante a fase de indução, como parâmetro anaeróbio. O teste do lactato mínimo é composto por três fases: 1. Fase de indução à hiperlactacidemia - realizado através de um esforço de 30 segundos e outro esforço até a exaustão (ambos com carga relativa de 13% do peso corporal), separados por 30 segundos de intervalo, 2. Fase de repouso passivo- com duração de nove minutos (para alcance do pico de lactato sanguíneo), 3. Fase de cargas incrementais (aumentando gradativamente) para determinação da intensidade em que se observa a menor lactacidemia, representando a maior intensidade de equilíbrio entre a produção e remoção de lactato (de Araujo et al., 2007; Tegtbur et al., 1993; Voltarelli et al., 2002) (ver **Figura 4**).

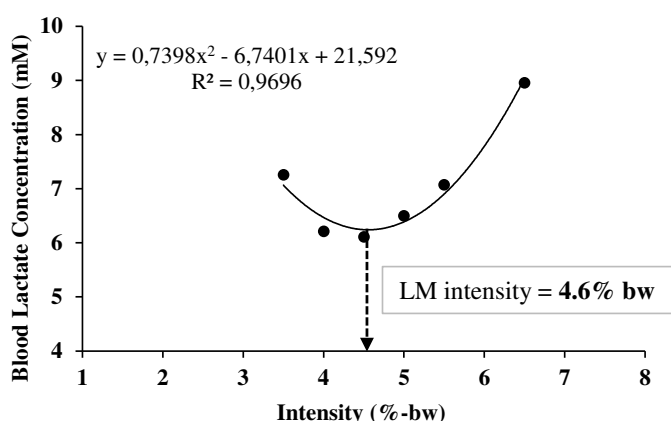


Figura 4. Representação gráfica do teste de Lactato Mínimo (TLM). Determinação da intensidade e valor de lactacidemia durante a fase incremental, caracterizando a intensidade do limiar anaeróbio.

4.8 Análise de lactato

No sangue: Para a determinação da concentração de lactato durante o TLM, amostras de sangue (25µL) foram coletadas da porção distal da cauda dos animais, utilizando tubos capilares heparinizados calibrados. As coletas foram realizadas após a fase de indução à hiperlactacidemia, e também após cada estágio do teste progressivo. As amostras foram imediatamente transferidas para tubos plásticos de 1,5mL contendo 400 µL de TCA (Ácido tricloroacético - 4%) para desproteinização do sangue. Posteriormente, foram extraídos 100µL de sobrenadante e transferidos para tubos de ensaio contendo 500µL de reativo (estoque glicina/EDTA e hidrazina-hidrato 1,2mL, 100mg de NAD (*Beta-nicotinamide dinucleotide* SIGMA) e 150µL de LDH (*L-lactic dehydrogenase bovine heart*)) devidamente ajustadas a um pH de 8,85. As amostras foram lidas a 340nm contra a curva de calibração. Os demais procedimentos analíticos ficaram condicionados às normas dos fabricantes dos kits comerciais para análises bioquímicas, adquiridos posteriormente e realizados em leitura U-V de microplacas.

No fluido cérebro espinhal (CSF): O CSF foi extraído manualmente com auxílio do aparelho estereotático. Uma agulha foi introduzida na cisterna magno através da pele e/ou duramater, conforme descrito na literatura (Silva et al., 2014). A extração foi feita no tempo basal, 90 e 240 minutos pós-exercício. Após a coleta, as amostras foram congeladas à -80°C. Posteriormente foi realizada a leitura de lactato (mmol/l) usando lactímetro Accutrend Plus Roche conforme descrito na literatura (Billat et al., 2003).

4.9 Canulação intracerebroventricular (ICV)

Os ratos foram anestesiados com 1mL de uma mistura de xilazina e quetamina na proporção 7:3. O procedimento foi iniciado quando percebeu-se a ausência de reflexos corneanos e de retirada da pata em resposta à dor. Os ratos foram adequadamente posicionados para realização de cirurgia estereotática e, após tricotomia e anti-sepsia da região craniana, foi realizada a incisão inter-parietal de aproximadamente 1,5 cm de extensão. A posteriori, o periósteo foi divulsionado e

com a calota craniana exposta, foi possível individualizar o bregma (referência para as coordenadas estereotáticas). A implantação das cânulas obedeceram às coordenadas estereotáticas previamente estabelecidas através de um atlas estereotático, para o terceiro ventrículo: AP (antero-posterior): -0,5mm, L (lateral): 0,0mm, V (vertical): -8,5mm. Depois de implantada, a cânula foi fixada ao crânio do animal com acrílico polimerizante conforme indicado na literatura (Silva et al., 2014).

4.10 Injeção Intracerebroventricular (ICV) de lactato e glicose

Após período de recuperação da cirurgia de estereotaxia, os animais permaneceram em jejum durante 8 horas e em seguida receberam injeção de lactato ou glicose. Posteriormente mensurou-se a ingestão alimentar desses animais e extraiu-se o hipotálamo para serem analisados.

Injeção de Lactato: Os ratos receberam injeção ICV aguda de lactato (5mmol/L) ou veículo conforme descrito na literatura (Lam et al., 2008) em um volume de 2µL às 18:00h para mensuração da ingestão alimentar durante 12h. Para análise de Western Blot, as amostras hipotálamo foram extraídas 8h após a injeção aguda de lactato.

Injeção de Glicose: Os ratos receberam injeção ICV de glicose ou veículo (100µg/µL) conforme descrito na literatura (Minokoshi et al., 2004) às 18:00h. A glicose foi injetada 15 minutos após o término do protocolo de exercício físico. O grupo sedentário recebeu glicose ou veículo no mesmo horário que o grupo exercitado, em seguida, foi mensurada a ingestão alimentar dos grupos após 12 horas da ICV.

4.11 Avaliação da ingestão alimentar

Após as respectivas injeções ICVs, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais para mensurar o consumo alimentar. A ração foi previamente pesada antes da injeção e após 4, 12 ou 24 horas da injeção, sendo a diferença entre as medidas, o valor referente à ingestão alimentar em gramas. Nos experimentos envolvendo a dieta hiperlipídica, os valores foram convertidos em quilocalorias (Kcal).

4.12 Anticorpos e técnicas de Western blot e produtos químicos

As amostras de células e hipotálamo foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT 100mM e aquecidas em água fervente por 4 minutos. A seguir, foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Tendo como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da Bio-Rad por 2 horas a 120 volts. Porém, no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) à 4°C *overnight*. Estas membranas foram então incubadas a 4°C *overnight* com anticorpos previamente descritos na literatura, diluídos em solução bloqueadora (com 0,3% de BSA ao invés de leite).

Após esse período as membranas foram lavadas com solução bloqueadora leite ou BSA, por 60 minutos e novamente incubadas com anticorpo secundário por duas horas. Posteriormente estas foram imersas em solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada e visualizada em uma máquina reveladora (Bio-Rad). As bandas foram quantificadas por densitometria óptica através do programa Uniscan. Os anticorpos utilizados foram: Anti-HIF2 α (*rabbit polyclonal GTX30114- GeneTex*,) para amostras de células, Anti-HIF2 α (*rabbit polyclonal SC- H310- 28706- Santa Cruz Biotechnology*); Anti-anti-PHD2/Egln1 (*rabbit polyclonal #3293- Cell Signalling*) e anti- β Tubulin (*rabbit polyclonal, #2146- Cell Signalling*). Lactato e Glicose foram comprados da empresa Sigma-Aldrich CO LTD.

4.13 Extração de tecidos

A extração de tecidos hipotalâmicos foi realizada após um período de jejum de 90 ou 240 minutos, nos animais submetidos ao protocolo de exercício físico agudo e 8 horas de jejum, nos animais submetidos à injeção ICV de lactato. As amostras foram estocadas à -80°C e antes da análise, estas foram homogeneizadas e preparadas no

gelo com adição de: 1% Triton X-100, 100 mmol l, 1 Tris pH 7.4, 100 mmol l, 1 sodium pyrophosphate, 100 mmol l, 1 sodium fluoride, 10 mmol l, 1 EDTA, 10 mmol l, 1 sodium vanadate, 2 mmol l, 1 phenyl PMSF and 0.1 mg aprotinin) para preservação dos estados de fosforilação das enzimas.

4.14 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 6, usando Test-t student, Anova-Oneway ou Two-way post host test, com risco de 5%. Todas as significâncias foram estabelecidas para valor p menor que 0.05 ($\pm$ SEM. $p < 0.05$ level).

Tabela 1

Ingredientes*	Dieta Padrão (Chow)		Dieta rica em gordura (HFD)	
	g kg ⁻¹	kcal kg ⁻¹	g kg ⁻¹	kcal kg ⁻¹
Amido de milho	397.5	1590	115.5	462
Caseína	200	800	200	800
Açúcar	100	400	100	400
Amido Dextrinizado	132	528	132	528
Gordura Saturada	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura de Mineral	35	-	35	-
Mistura de Vitaminas	10	-	10	-
L-Cystina	3	-	3	-
Coline	2.5	-	2.5	-
Total (em kcal)	1000	3.948	1000	5.358

*Composição centesimal de dieta padrão e dieta rica em gordura.

5. Resultados

5.1 Obesidade reduz sensibilidade à glicose no hipotálamo

Durante 12 semanas, um grupo de ratos Wistar foram alimentados com dieta rica em gordura (HFD), de alto teor calórico e um grupo controle foi alimentado com dieta padrão (Chow). Observamos, como esperado, aumento no peso corporal e no consumo alimentar dos ratos do grupo HFD quando comparados ao grupo controle Chow (Figura 5A e 5C), bem como aumento nos níveis glicêmicos (Figura 5B). Nós analisamos o consumo alimentar após injeção intracerebroventricular (ICV) com glicose em ratos magros e obesos, com o objetivo de analisar a sensibilidade do hipotálamo em reconhecer este nutriente. De fato, os animais obesos permaneceram consumindo mais alimento do que os animais magros, caracterizando assim, a redução da sensibilidade à glicose no hipotálamo em animais obesos (Figura 5D). De maneira interessante, encontramos também que o consumo de dieta rica em gordura reduziu os níveis de Hif2 α mas não de Hif1 α (Figura 5E). Posteriormente, encontramos redução nos níveis mRNA de Glut1 e Glut2, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0.0626$ para Glut1 e $p=0.0679$ para Glut2) (Figura 5F). Encontramos também aumento de mRNA neuropeptídeo orexigênico AgRP. Não houve diferença entre os grupos nos níveis mRNA de Npy (Figura 5G). Estes dados sugerem que o consumo de dieta rica em gordura causou perda de sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos e comprometeu a expressão de Hif2 α no hipotálamo.

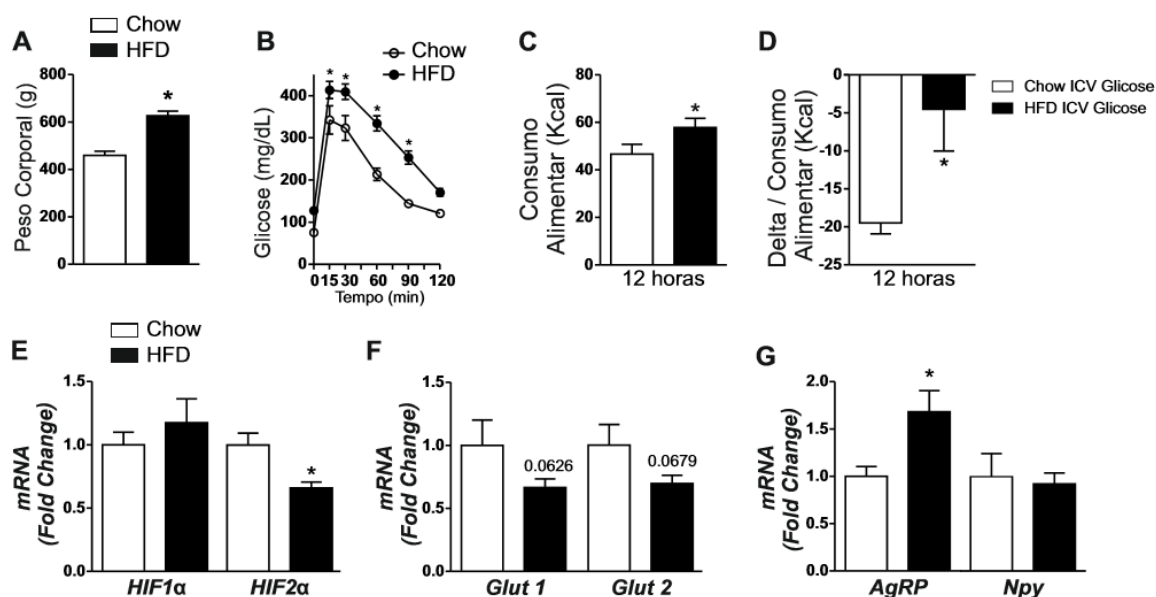


Figura 5. Obesidade causa perda de sensibilidade à glicose no hipotálamo. A) Peso corporal (g) (n=12-16 por grupo), B) Teste de Tolerância à Glicose (TTG)(mg/dl)(n=7-10 por grupo), C e D) Consumo alimentar (n=6-8 por grupo), E) Expressão de mRNA (RNA mensageiro) HIF1 α e HIF2 α , F) Expressão de Glut 1 e Glut 2, G) Expressão de AgRP e Npy (n=4-6 por grupo) em ratos submetidos a dieta com baixo teor de gordura (Chow) ou alto teor de gordura (HFD). As análises foram feitas após 12 semanas do consumo alimentar com dieta HFD ou Chow. O consumo alimentar foi mensurado 12 horas em condições basais ou após o tratamento agudo com ICV de glicose. *P<0.05. vs o grupo HFD.

5.2 Exercício físico aumenta sensibilidade á glicose em hipotálamo de ratos obesos.

Uma vez caracterizada a perda de sensibilidade à glicose hipotalâmica em ratos obesos, realizamos o protocolo de natação agudo (Figuras 6A, 6B e 6E) para verificar os efeitos do exercício físico neste parâmetro. Os resultados revelaram que houve melhora na glicemia de jejum e redução do consumo alimentar pós-exercício (Figura 6C e 6D). Os grupos que receberam apenas injeção ICV salina ou ICV glicose, bem como o grupo submetido somente ao protocolo de exercício físico não mostraram diferença estatísticas no consumo alimentar (Figura 6F). Porém, observamos uma redução da ingestão alimentar nos ratos obesos que receberam injeção ICV de glicose após o protocolo de exercício agudo, quando comparados aos demais grupos (Figura 6F). Estes dados mostram que o exercício agudo melhorou a sensibilidade à glicose e reduziu o consumo alimentar em ratos obesos.

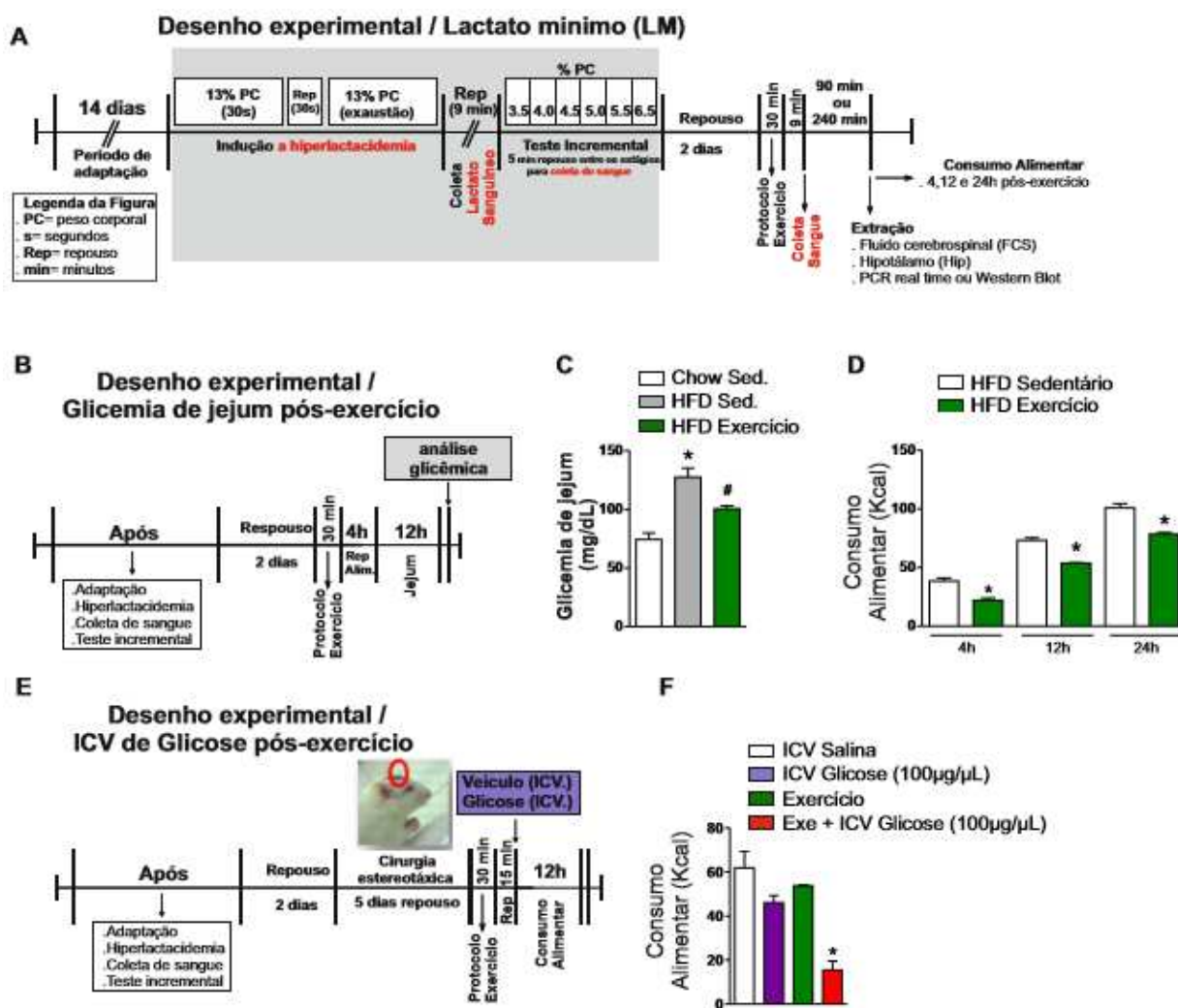


Figura 6. Exercício físico melhora a sensibilidade à glicose em hipotálamo de ratos obesos. A) Desenho experimental do protocolo de lactato mínimo, B) Desenho experimental do teste de glicemia de jejum pós-exercício, C) Glicemia de jejum (n=7-10 por grupo), D) Consumo alimentar pós-exercício (n=8 por grupo), E) Desenho experimental da Injeção ICV de glicose após o exercício, F) Consumo alimentar de ICV glicose pós-exercício (n=6-8 por grupo). *p<0.05. vs grupo Chow Sed ou HFD exercício. *p<0.05. vs HFD Sedentário. *p<0.05. vs ICV Salina, ICV Glicose (100µg/µL) ou exercício.

5.3 Exercício físico aumenta os níveis de HIF em hipotálamo de ratos magros e obesos

Noventa minutos após o protocolo de exercício físico de natação avaliamos a expressão de mRNA de HIF2α no hipotálamo de ratos magros e obesos. Inicialmente, observamos que o exercício físico aumentou os níveis de mRNA e o conteúdo proteico de HIF2α, em ratos magros (Figura 7A e 4B). Posteriormente, observamos resultados similares em ratos que consumiram dieta rica em gordura. O exercício físico aumentou os níveis de mRNA de HIF2α (Figura 7C), acompanhado de redução

do conteúdo proteico de Phd2 (Figura 7D). Nós também avaliamos os níveis de mRNA de Glut1, Glut2, Pomc e Cart. No entanto, embora tenhamos notado o aumento da expressão destes genes, não encontramos diferença significativa entre os grupos (Figura 7E e 7F). Assim, estes dados sugerem, em parte, que o exercício físico pode modular os níveis de Hif2 α no hipotálamo de ratos magros e obesos.

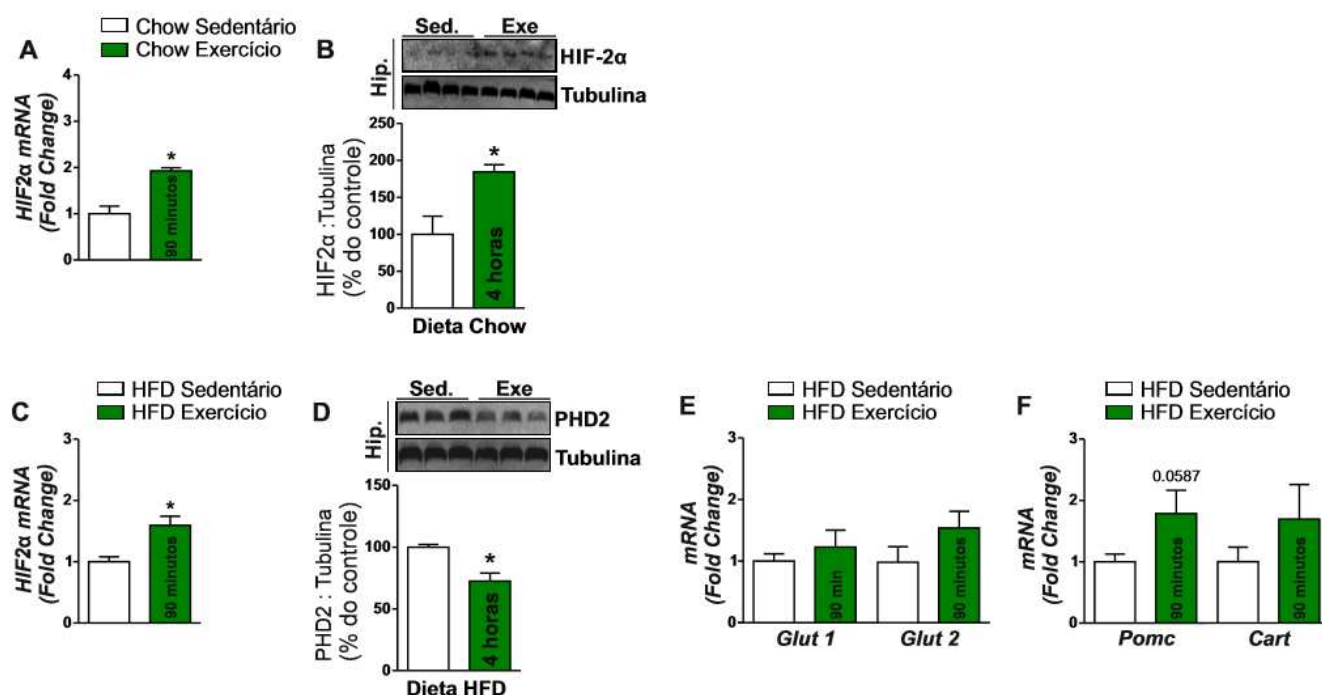


Figura 7. Exercício físico aumenta a expressão de HIF hipotalâmica em ratos. A) mRNA de HIF2 α no hipotálamo de ratos magros (n=3 por grupo), B) Conteúdo proteico de HIF2 α no hipotálamo de ratos magros (4 por grupo), C) mRNA de HIF2 α no hipotálamo de ratos obesos (n=4 a 6 por grupo, D) Conteúdo proteico de PHD2 no hipotálamo de ratos obesos (4 por grupo), E) mRNA de Glut1 e Glut2 no hipotálamo de ratos obesos (n=4 a 6 por grupo, F) mRNA de Pomc e Cart no hipotálamo de ratos obesos (n=4 a 6 por grupo). As amostras de hipotálamo para mRNA foram coletadas 90 minutos após o protocolo de exercício físico agudo. As amostras de hipotálamo para análise proteica foram coletadas 4 horas após o protocolo de exercício físico agudo. *P<0.05. vs grupo Chow Sedentário ou HFD Sedentário.

5.4 Exercício físico aumenta os níveis periféricos e centrais de lactato em ratos

Nós encontramos aumento de lactato nos níveis séricos e também no fluido cefalorraquidiano de ratos magros (Figura 8A e 8B). Resultados similares foram encontrados nos níveis séricos de ratos obesos (Figura 8C).

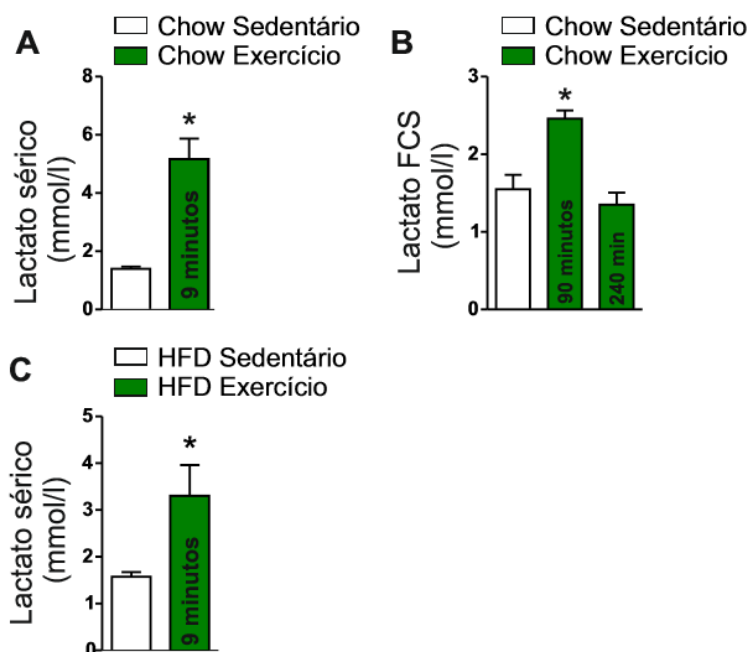


Figura 8. O exercício físico agudo aumenta a produção de lactato sérico e central em ratos. A) Níveis séricos de lactato (mmol/L) em ratos magros (n=9-24 por grupos), B) Níveis centrais lactato (mmol/L) no fluido cerebrospinal (FCS) em ratos magros (n=5-12 por grupos), C) Níveis séricos de lactato (mmol/L) em ratos obesos (n=9-24 por grupos). *P<0.05. vs Chow Sedentário, Chow exercício (240 min) ou HFD sedentário.

5.5 Injeção intracerebroventricular (ICV) de lactato aumenta a expressão da HIF no hipotálamo e reduz a ingestão alimentar em ratos magros

Após observar que o exercício físico aumentou a expressão de HIF2 α no hipotálamo e também os níveis séricos e centrais de lactato, postulamos que a esse aumento na expressão de HIF2 α hipotalâmica poderia ser mediada pelo lactato. Primeiramente, demonstramos, *in vitro*, que o tratamento com lactato (5mmol) em células neuronais adultas GT1-7 aumentou o conteúdo proteico de HIF2 α após 24 e 48 horas (Figura 9A). Assim, estrategicamente, utilizamos o tratamento farmacológico de ratos magros com injeção ICV agudo de lactato. Comprovando nossa hipótese, demonstramos que houve aumento no conteúdo proteico de HIF2 α e redução de PHD2 no hipotálamo de ratos magros 8 horas após o tratamento agudo com lactato, bem como houve redução da ingestão alimentar 12 horas após o tratamento (Figuras 9B, 9C e 9D). Tomados em conjuntos, estes resultados demonstram que a expressão de HIF2 α neuronal parece ser dependente de lactato.

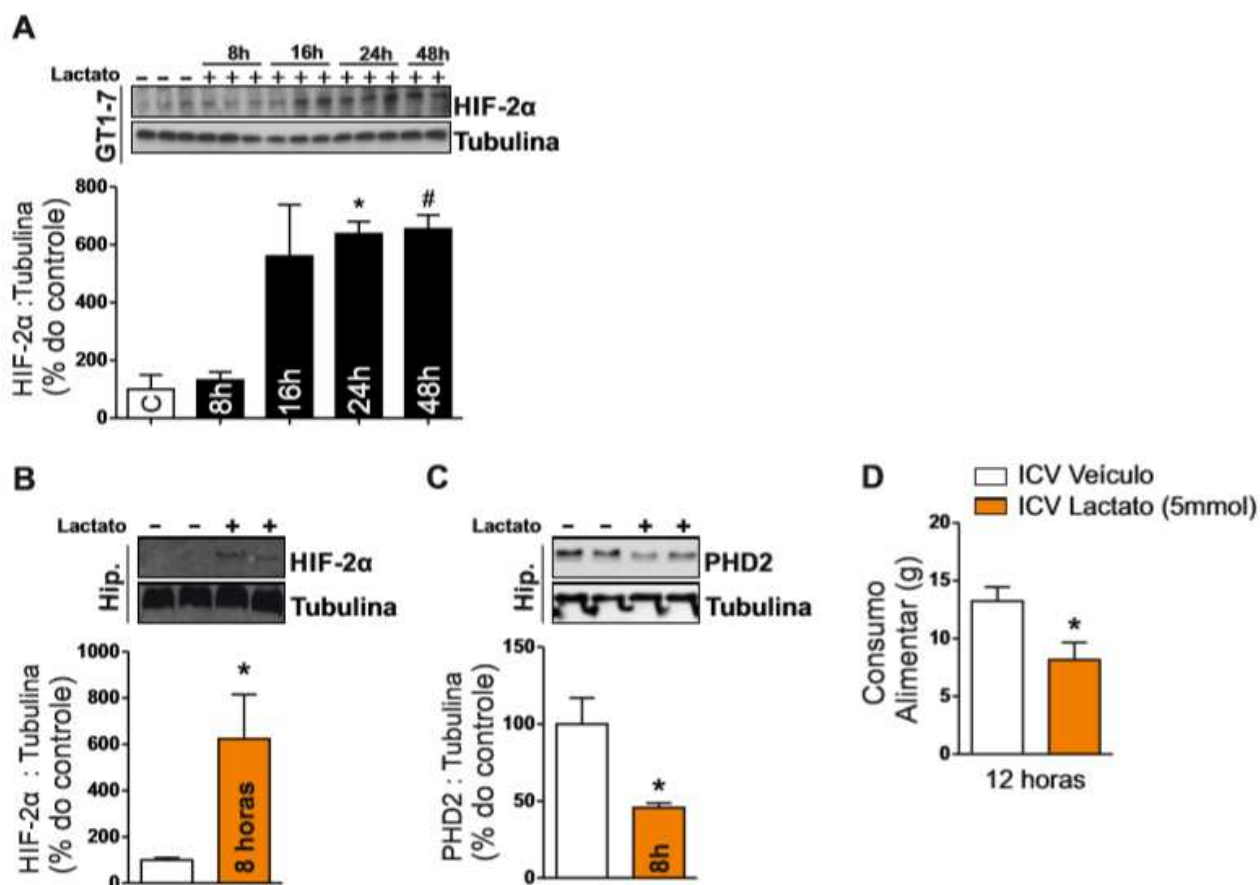


Figura 9. O lactato aumenta o conteúdo proteico de HIF2α *in vitro* e *in vivo*. A) Conteúdo proteico de HIF2α em células GT1-7 (n=2-3 por grupo), B) Conteúdo proteico de HIF2α no hipotálamo, C) Conteúdo proteico de PHD2 no hipotálamo (n=8 por grupo), D) Ingestão alimentar (n=13-16 por grupo). As amostras de células e hipotálamo foram tratadas com 5mmol de lactato. A extração de proteínas foi realizada 8h, 16h, 24h e 48h após a injeção de lactato e no hipotálamo, após 8h do tratamento. A ingestão alimentar foi mensurada 12h após o tratamento com lactato. A ingestão alimentar foi mensurada durante 5 dias para as análises de consumo pareado. *P<0.05. vs ICV veículo.

5.6 Avaliação da toxicidade da injeção ICV de lactato em ratos magros

Para verificar se a redução do consumo alimentar dos animais tratados ICV com lactato não foi devido à toxicidade desse composto, realizamos o pareamento do consumo alimentar destes animais durante 3 dias. Quando interrompido o tratamento com lactato, os animais voltaram a se alimentar de maneira similar aos seus respectivos grupos controles, mostrando assim, que a dose de lactato utilizada não foi tóxica. (Figura 10).

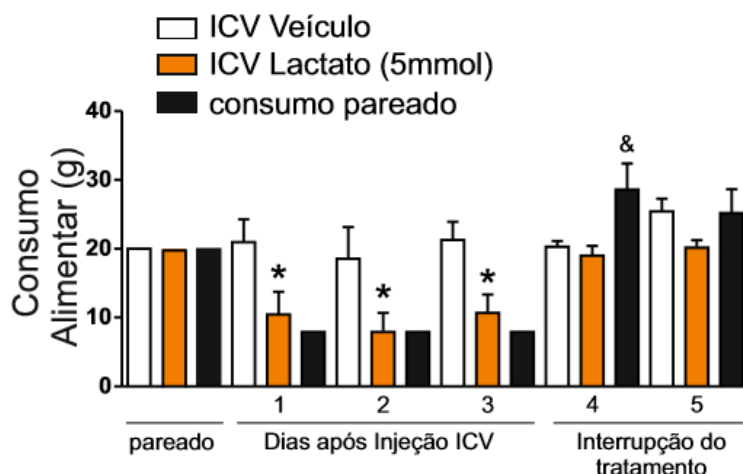


Figura 10. Consumo alimentar após tratamento ICV de Lactato e toxicidade no hipotálamo de ratos. A ingestão alimentar foi mensurada durante 5 dias para as análises de consumo pareado (n=4-5 por grupo). *P<0.05. vs ICV veículo ou consumo pareado. &P<0.05. vs ICV veículo ou ICV lactato.

5.7 Injeção ICV de lactato aumenta a expressão da HIF no hipotálamo e reduz a ingestão alimentar em ratos obesos

A redução da expressão de HIF2 α hipotalâmica causa hiperfagia e desarranjo na homeostase energética em roedores. Por outro lado, a sua super expressão protege contra o ganho de peso (Zhang et al., 2011) e obesidade. Aqui, nós tratamos ratos obesos com uma única injeção de lactato no hipotálamo e avaliamos o conteúdo proteico de HIF2 α e também o consumo alimentar. A injeção de lactato aumentou a expressão de HIF2 α 8 horas após a infusão de lactato e reduziu o consumo alimentar 12 horas após o tratamento (Figura 11A e 11B).

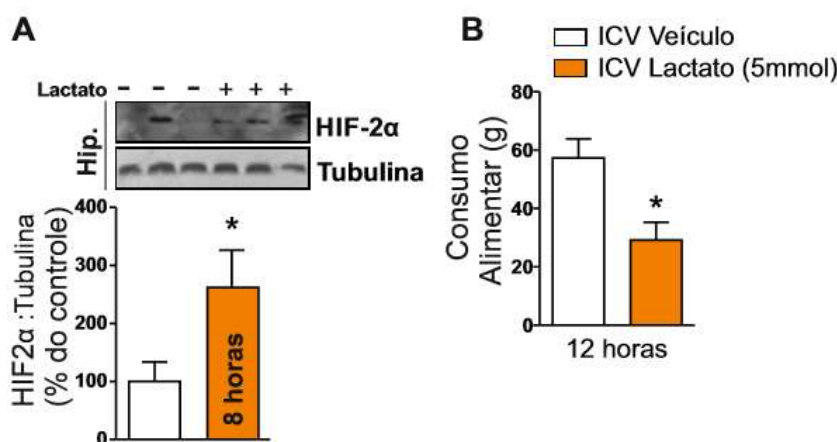


Figura 11. Injeção aguda de lactato aumenta o conteúdo proteico de HIF2 α hipotalâmica e reduz o consumo alimentar em ratos obesos. A) Análise proteica de HIF2 α (n=6 por grupo), B) Ingestão alimentar (n=4-6 por grupo). As amostras

hipotalâmicas foram coletadas 8h após infusão de lactato. O consumo alimentar foi analisado 12h após a injeção de lactato. * $P < 0.05$. vs ICV Veículo.

6. Discussão

O hipotálamo é uma das regiões do cérebro responsáveis pelo controle da fome e do gasto energético em mamíferos, através da interação entre neurônios e sinais hormonais e nutricionais (Minokoshi et al., 2004; Parton et al., 2007; Spiegelman and Flier, 2001; Waterson and Horvath, 2015; Zhang et al., 2011). Dentre os sinais nutricionais, a glicose tem destaque no controle do consumo alimentar. Estudos demonstraram que a perda seletiva de sensibilidade à glicose em neurônios causa hiperfagia e obesidade (Minokoshi et al., 2004; Parton et al., 2007; Zhang et al., 2011). Sabendo-se que a HIF2 α é uma proteína neuronal, abundantemente encontrada no hipotálamo (Zhang et al., 2011), foram conduzidos estudos para determinar seu papel nessa região do cérebro. Foi demonstrado que a perda de função de HIF2 α reduziu a capacidade dos neurônios detectarem a presença de glicose, resultando em aumento da ingestão alimentar e peso corporal em camundongos (Zhang et al., 2011). Por outro lado, a indução da expressão de HIF2 α hipotalâmica com lentivírus contribuiu para a manutenção do peso corporal e preveniu a obesidade em camundongos (Zhang et al., 2011).

No presente trabalho observamos que ratos submetidos à dieta rica em gordura (HFD) tiveram seu peso corporal aumentado, piores índices glicêmicos e perda de sensibilidade à glicose hipotalâmica. O que corrobora os achados de que a perda seletiva da sensibilidade à glicose em neurônios hipotalâmicos causa hiperfagia em roedores (Minokoshi et al., 2004; Parton et al., 2007; Zhang et al., 2011).

O exercício físico é responsável por diversas melhorias no metabolismo, dentre elas, a maior efetividade no consumo de glicose (Andersen et al., 2014; Stanford and Goodyear, 2014; Van Der Heijden et al., 2010; Van Dijk et al., 2013). Em nosso modelo experimental, o exercício agudo de natação melhorou a glicemia de jejum e a sensibilidade à glicose neuronal, bem como diminuiu o consumo alimentar de ratos obesos. Nós também mostramos que o exercício físico agudo aumentou os níveis séricos de lactato e a expressão de HIF2 α hipotalâmica e reduziu o consumo alimentar em ratos obesos.

Além de aumentar os níveis séricos de lactato, observamos que o exercício físico agudo foi capaz de aumentar os níveis centrais de lactato no fluido cerebrospinal. Ambos resultados eram esperados de acordo com a literatura (Abro et al., 2009;

Chen et al., 2017; de Araujo et al., 2013; de Araujo et al., 2007; Gobatto et al., 2001; Nakano et al., 2017; Nazir et al., 2017; Stefani et al., 2017; Voltarelli et al., 2002).

Segundo alguns autores, o lactato periférico pode ultrapassar a barreira hematoencefálica e ter ação na via anorexigênica em roedores (Bergersen, 2007; Cha and Lane, 2009; Proia et al., 2016). O lactato modula HIFs (Sonveaux et al., 2012; Zhang et al., 2011), e estas por sua vez, tem capacidade de expressar neurônios POMC no hipotálamo, os quais controlam a fome (Parton et al., 2007; Varela et al., 2017; Zhang et al., 2011).

Em nosso estudo, o aumento dos níveis centrais de lactato após o exercício físico em ratos obesos foi acompanhado pelo aumento da expressão de HIF2 α hipotalâmica e níveis de mRNA de neuropeptídeo POMC. Estes dados sugerem que os efeitos anorexigênicos promovidos pelo exercício físico podem ser resultado do aumento de lactato e consequentemente, aumento da expressão de HIF2 α (**Figura 12**). De acordo com a literatura, a injeção de lactato ICV também é capaz de aumentar a expressão de neuropeptídeo POMC e reduzir neurônios Npy no hipotálamo de ratos (Cha and Lane, 2009).

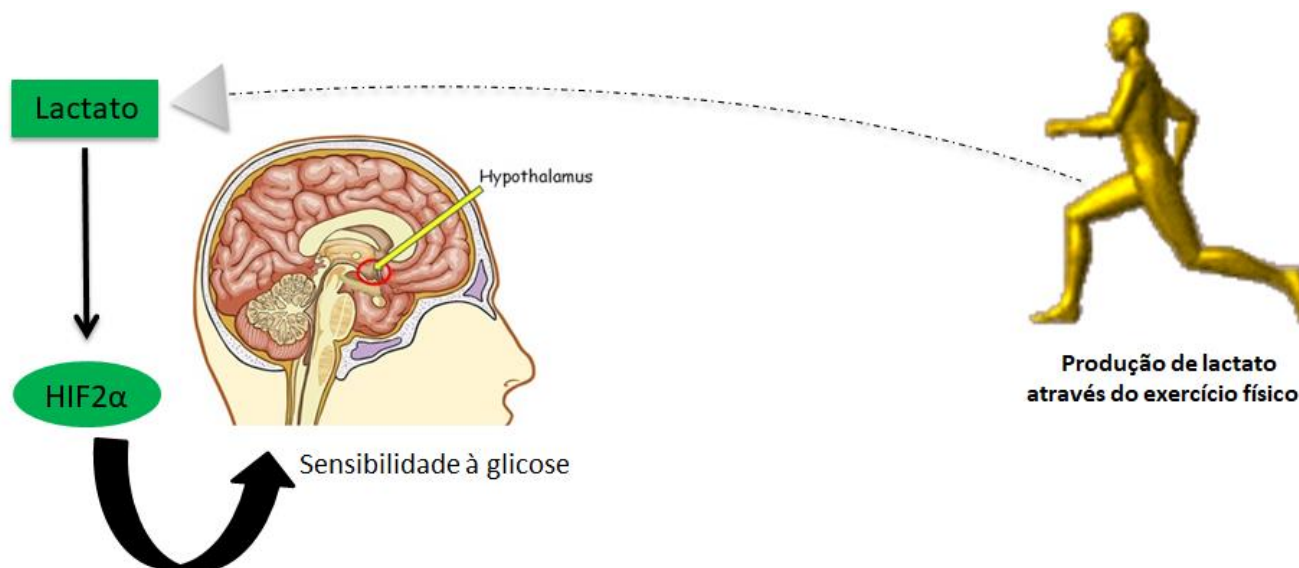


Figura 12. Modelo esquemático sobre o efeito do exercício físico na modulação da expressão de HIF2 α no hipotálamo, através da indução na produção de lactato, melhorando a sensibilidade à glicose no hipotálamo. Durante o exercício físico, por meio da contração muscular, há aumento da produção de lactato (glicólise anaeróbia). Este lactato é liberado na corrente sanguínea e transportado para o fígado (gliconeogênese), para o coração, no entanto, parte do lactato sanguíneo atravessa a barreira hemato-encefálica chegando ao cérebro. No cérebro, em

particular no hipotálamo, o lactato aumenta a expressão de HIF2 α que por sua vez transcreve genes da sensibilidade à glicose hipotalâmica.

Os sub-produtos da glicólise parecem regular a saciedade através do controle da expressão de HIFs. O tratamento com injeção ICV de fumarato e succinato foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de HIF2 α no hipotálamo de camundongo (Zhang et al., 2011), enquanto o tratamento com lactato aumentou o conteúdo proteico de HIF1 α em células endoteliais (Sonveaux et al., 2012).

Nós demonstramos aqui que tanto o tratamento *in vitro* com lactato em células neuronais hipotalâmicas adultas, quanto a administração *in vivo* de lactato no hipotálamo de ratos magros e obesos, foram capazes de aumentar o conteúdo proteico de HIF2 α . Posteriormente, observamos também que a administração de lactato reduziu o consumo alimentar de ratos magros e obesos. Nossos dados corroboram a literatura, no que diz respeito aos efeitos anorexigênicos do lactato central e ao papel de HIF2 α em modular a sensibilidade à glicose em neurônios responsivos ao controle da fome (Cha and Lane, 2009; Lam et al., 2008; Zhang et al., 2011).

Considerações finais

Algumas evidências na literatura mostram que lactato parece modular a ação anorexigênica da HIF2 α pela via AMPK hipotalâmica. O aumento da expressão de AMPK no hipotálamo provoca hiperfagia e obesidade (López et al., 2016; Minokoshi et al., 2004; Pimentel et al., 2013). Estudos demonstraram que a administração de lactato intraperitoneal (IP) e ICV reduziu a fosforilação de AMPK no hipotálamo de ratos (Cha and Lane, 2009), em adição, a expressão de HIF2 α foi capaz de reduzir a expressão de AMPK em hipotálamo de camundongos (Zhang et al., 2011). No entanto, nós não investigamos a via AMPK hipotalâmica em nossos modelos experimentais.

Assim, estudos posteriores seriam interessante investigar a modulação da via AMPK no hipotálamo via HIF2 α perante o exercício físico, bem como o papel de transportadores de lactato (MCTs) e do receptor GPR81 no hipotálamo, já que alguns autores sugerem haver uma relação entre os MCTs no controle da fome, e do GPR81 no controle da homeostase energética (Cortes-Campos et al., 2013; Elizondo-Vega et al., 2016; Wanders et al., 2012).

7. Conclusão

Nossos resultados demonstraram que a proteína HIF2 α hipotalâmica é modulada, ao menos em parte, pelo lactato. Além disso, mostramos, pela primeira vez, que o exercício físico agudo modula a expressão de HIF2 α no hipotálamo, mediada, em partes, pela indução na produção de lactato, melhorando a sensibilidade à glicose no hipotálamo e diminuindo o consumo alimentar, contribuindo assim, para a manutenção do peso corporal de ratos obesos. Dessa forma, evidenciamos mais um mecanismo de como o exercício físico contribui para manutenção do peso corporal via modulação de HIF2 α hipotalâmica, sugerindo que essa proteína pode ser um alvo para combater a obesidade e doenças metabólicas.

8. Referências Bibliográficas

Portal Brasil - Ministério da Saúde.

Abro, A.H., Abdou, A.S., Ustadi, A.M., Saleh, A.A., Younis, N.J., and Doleh, W.F. (2009). CSF lactate level: a useful diagnostic tool to differentiate acute bacterial and viral meningitis. *J Pak Med Assoc* 59, 508-511.

Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Müller, M., Gille, A., Sassmann, A., Hanson, J., and Offermanns, S. (2010). An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab* 11, 311-319.

Ainscow, E.K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M.L., and Rutter, G.A. (2002). Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels. *J Physiol* 544, 429-445.

Andersen, T.R., Schmidt, J.F., Thomassen, M., Hornstrup, T., Frandsen, U., Randers, M.B., Hansen, P.R., Krstrup, P., and Bangsbo, J. (2014). A preliminary study: effects of football training on glucose control, body composition, and performance in men with type 2 diabetes. *Scand J Med Sci Sports* 24 Suppl 1, 43-56.

Beck, W.R., Botezelli, J.D., Pauli, J.R., Ropelle, E.R., and Gobatto, C.A. (2015). Melatonin Has An Ergogenic Effect But Does Not Prevent Inflammation and Damage In Exhaustive Exercise. *Sci Rep* 5, 18065.

Bento, C.F., and Pereira, P. (2011). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia* 54, 1946-1956.

Bergersen, L.H. (2007). Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145, 11-19.

Berrington de Gonzalez, A., Hartge, P., Cerhan, J.R., Flint, A.J., Hannan, L., MacInnis, R.J., Moore, S.C., Tobias, G.S., Anton-Culver, H., Freeman, L.B., et al. (2010). Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med* 363, 2211-2219.

Billat, V.L., Sirvent, P., Py, G., Koralsztejn, J.P., and Mercier, J. (2003). The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med* 33, 407-426.

Blouet, C., Jo, Y.H., Li, X., and Schwartz, G.J. (2009). Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J Neurosci* 29, 8302-8311.

Blouet, C., Ono, H., and Schwartz, G.J. (2008). Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab* 8, 459-467.

Brooks, G.A. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol* 587, 5591-5600.

Carrard, A., Elsayed, M., Margineanu, M., Boury-Jamot, B., Fragnière, L., Meylan, E.M., Petit, J.M., Fiumelli, H., Magistretti, P.J., and Martin, J.L. (2016). Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry*.

Carrière, A., Jeanson, Y., Berger-Müller, S., André, M., Chenouard, V., Arnaud, E., Barreau, C., Walther, R., Galinier, A., Wdziekonski, B., et al. (2014). Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* 63, 3253-3265.

Cha, S.H., and Lane, M.D. (2009). Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 212-216.

Chatham, J.C. (2002). Lactate -- the forgotten fuel! *J Physiol* 542, 333.

- Chen, C.J., Liao, Y.H., Lin, S.Y., Yu, J.X., Li, Z.J., Lin, Y.C., Chang, G.J., Lin, C.H., and Wong, A.M. (2017). Diet-induced obesity accelerates blood lactate accumulation of rats in response to incremental exercise to maximum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *ajpregu.00337.02016*.
- Chiarreotto-Ropelle, E.C., Pauli, L.S., Katashima, C.K., Pimentel, G.D., Picardi, P.K., Silva, V.R., de Souza, C.T., Prada, P.O., Cintra, D.E., Carnevali, J.B., et al. (2013). Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *305*, E649-659.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., et al. (2002). Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* *8*, 702-710.
- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Carril, C., Martínez, F., Boric, K., Nualart, F., and García-Robles, M.A. (2013). MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *PLoS One* *8*, e62532.
- Cortés-Campos, C., Elizondo, R., Llanos, P., Uranga, R.M., Nualart, F., and García, M.A. (2011). MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction. *PLoS One* *6*, e16411.
- Dalsgaard, M.K., Quistorff, B., Danielsen, E.R., Selmer, C., Vogelsang, T., and Secher, N.H. (2004). A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *J Physiol* *554*, 571-578.
- de Araujo, G.G., Papoti, M., Delbin, M.A., Zanesco, A., and Gobatto, C.A. (2013). Physiological adaptations during endurance training below anaerobic threshold in rats. *Eur J Appl Physiol* *113*, 1859-1870.
- de Araujo, G.G., Papoti, M., Manchado, F.e.B., de Mello, M.A., and Gobatto, C.A. (2007). Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *148*, 888-892.
- Demidenko, Z.N., and Blagosklonny, M.V. (2011). The purpose of the HIF-1/PHD feedback loop: to limit mTOR-induced HIF-1 α . *Cell Cycle* *10*, 1557-1562.
- Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M.J., Oyarce, K.A., Carril, C.A., and García-Robles, M.A. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med* *19*, 1471-1482.
- Elizondo-Vega, R., Cortés-Campos, C., Barahona, M.J., Carril, C., Ordenes, P., Salgado, M., Oyarce, K., and García-Robles, M.L. (2016). Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep* *6*, 33606.
- Febbraio, M.A. (2017). Exercise metabolism in 2016: Health benefits of exercise - more than meets the eye! *Nat Rev Endocrinol* *13*, 72-74.
- García, M., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., et al. (2003). Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* *86*, 709-724.
- Gladden, L.B. (2008). Current trends in lactate metabolism: introduction. *Med Sci Sports Exerc* *40*, 475-476.
- Gobatto, C.A., de Mello, M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., and Kokubun, E. (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *130*, 21-27.
- Haque, M.S., Minokoshi, Y., Hamai, M., Iwai, M., Horiuchi, M., and Shimazu, T. (1999). Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose

- uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48, 1706-1712.
- Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331-1340.
- Ide, K., Schmalbruch, I.K., Quistorff, B., Horn, A., and Secher, N.H. (2000). Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol* 522 Pt 1, 159-164.
- Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30, 393-402.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.
- Katashima, C.K., Silva, V.R.R., Lenhare, L., Marin, R.M., and Carvalheira, J.B.C. (2017). iNOS promotes hypothalamic insulin resistance associated with deregulation of energy balance and obesity in rodents. *Sci Rep* 7, 9265.
- Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.
- Lam, C.K., Chari, M., Wang, P.Y., and Lam, T.K. (2008). Central lactate metabolism regulates food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E491-496.
- Lam, T.K. (2010). Neuronal regulation of homeostasis by nutrient sensing. *Nat Med* 16, 392-395.
- Lam, T.K., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., and Rossetti, L. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309, 943-947.
- López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Diéguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol* 12, 421-432.
- Martínez de Morentin, P.B., and López, M. (2010). "Mens sana in corpore sano": exercise and hypothalamic ER stress. *PLoS Biol* 8.
- Matsui, T., Ishikawa, T., Ito, H., Okamoto, M., Inoue, K., Lee, M.C., Fujikawa, T., Ichitani, Y., Kawanaka, K., and Soya, H. (2012). Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. *J Physiol* 590, 607-616.
- Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yañez, M.J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., et al. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2, e00035.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foulfelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.
- Mosienko, V., Teschemacher, A.G., and Kasparov, S. (2015). Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *J Cereb Blood Flow Metab* 35, 1069-1075.
- Nakano, F., Sakushima, K., Umeki, R., Yabe, I., Endoh, A., and Sasaki, H. (2017). Effects of age and glucose levels on lactate levels in cerebrospinal fluid examination of neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 378, 45-48.
- Nazir, M., Wani, W.A., Malik, M.A., Mir, M.R., Ashraf, Y., Kawoosa, K., and Ali, S.W. (2017). Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. *J Pediatr (Rio J)*.
- Noakes, T.D. (2009). Evidence that reduced skeletal muscle recruitment explains the lactate paradox during exercise at high altitude. *J Appl Physiol* (1985) 106, 737-738.
- Orellana, J.A., Sáez, P.J., Cortés-Campos, C., Elizondo, R.J., Shoji, K.F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J.X., Nualart, F., et al. (2012). Glucose

increases intracellular free Ca^{2+} in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* 60, 53-68.

Organization, W.H. (2017). Obesity and overweight.

Pan, W.W., and Myers, M.G. (2018). Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci* 19, 95-105.

Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228-232.

Pedersen, B.K., and Saltin, B. (2015). Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* 25 Suppl 3, 1-72.

Pimentel, G.D., Ropelle, E.R., Rocha, G.Z., and Carnevalheira, J.B. (2013). The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. *Metabolism* 62, 171-178.

Porte, D., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54, 1264-1276.

Proia, P., Di Liegro, C.M., Schiera, G., Fricano, A., and Di Liegro, I. (2016). Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 17.

Pérez de Heredia, F., Wood, I.S., and Trayhurn, P. (2010). Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflugers Arch* 459, 509-518.

Ropelle, E.R., Flores, M.B., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Pauli, J.R., Morari, J., de Souza, C.T., Moraes, J.C., Prada, P.O., Guadagnini, D., et al. (2010). IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 8.

Scheerer, N., Dehne, N., Stockmann, C., Swoboda, S., Baba, H.A., Neugebauer, A., Johnson, R.S., and Fandrey, J. (2013). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Essential for Skeletal Muscle Regeneration in Mice. *J Immunol*.

Schwartz, M.W., and Porte, D. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307, 375-379.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

Shiuchi, T., Haque, M.S., Okamoto, S., Inoue, T., Kageyama, H., Lee, S., Toda, C., Suzuki, A., Bachman, E.S., Kim, Y.B., et al. (2009). Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* 10, 466-480.

Silva, V.R., Katashima, C.K., Bueno Silva, C.G., Lenhare, L., Micheletti, T.O., Camargo, R.L., Ghezzi, A.C., Camargo, J.A., Assis, A.M., Tobar, N., et al. (2016). Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis in Middle-Aged Rodents: the reversal effects of physical exercise. *Aging (Albany NY)*.

Silva, V.R., Micheletti, T.O., Pimentel, G.D., Katashima, C.K., Lenhare, L., Morari, J., Mendes, M.C., Razolli, D.S., Rocha, G.Z., de Souza, C.T., et al. (2014). Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis. *Nat Commun* 5, 4859.

Silva, V.R.R., Katashima, C.K., Lenhare, L., Silva, C.G.B., Morari, J., Camargo, R.L., Velloso, L.A., Saad, M.A., da Silva, A.S.R., Pauli, J.R., et al. (2017). Chronic exercise reduces hypothalamic transforming growth factor- β 1 in middle-aged obese mice. *Aging (Albany NY)* 9, 1926-1940.

- Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C.J., Végran, F., Verrax, J., Kennedy, K.M., Moon, E.J., Dhup, S., Danhier, P., Frérart, F., et al. (2012). Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* 7, e33418.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.
- Stanford, K.I., and Goodyear, L.J. (2014). Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Adv Physiol Educ* 38, 308-314.
- Stefani, M.A., Modkovski, R., Hansel, G., Zimmer, E.R., Kopczynski, A., Muller, A.P., Strogulski, N.R., Rodolphi, M.S., Carteri, R.K., Schmidt, A.P., et al. (2017). Elevated glutamate and lactate predict brain death after severe head trauma. *Ann Clin Transl Neurol* 4, 392-402.
- Takimoto, M., and Hamada, T. (2014). Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins. *J Appl Physiol* (1985) 116, 1238-1250.
- Tegtbur, U., Busse, M.W., and Braumann, K.M. (1993). Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 25, 620-627.
- Thorens, B. (2012). Sensing of glucose in the brain. *Handb Exp Pharmacol*, 277-294.
- van de Sande-Lee, S., Pereira, F.R., Cintra, D.E., Fernandes, P.T., Cardoso, A.R., Garlipp, C.R., Chaim, E.A., Pareja, J.C., Geloneze, B., Li, L.M., et al. (2011). Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes* 60, 1699-1704.
- Van Der Heijden, G.J., Wang, Z.J., Chu, Z., Toffolo, G., Manesso, E., Sauer, P.J., and Sunehag, A.L. (2010). Strength exercise improves muscle mass and hepatic insulin sensitivity in obese youth. *Med Sci Sports Exerc* 42, 1973-1980.
- Van Dijk, J.W., Manders, R.J., Canfora, E.E., Mechelen, W.V., Hartgens, F., Stehouwer, C.D., and Van Loon, L.J. (2013). Exercise and 24-h glycemic control: equal effects for all type 2 diabetes patients? *Med Sci Sports Exerc* 45, 628-635.
- van Hall, G., Strømstad, M., Rasmussen, P., Jans, O., Zaar, M., Gam, C., Quistorff, B., Secher, N.H., and Nielsen, H.B. (2009). Blood lactate is an important energy source for the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1121-1129.
- Varela, L., Suyama, S., Huang, Y., Shanabrough, M., Tschöp, M.H., Gao, X.B., Giordano, F.J., and Horvath, T.L. (2017). Endothelial HIF-1 α Enables Hypothalamic Glucose Uptake to Drive POMC Neurons. *Diabetes* 66, 1511-1520.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2011). Nothing Iffy about HIF in the Hypothalamus. *PLoS Biol* 9, e1001116.
- Voltarelli, F.A., Gobatto, C.A., and de Mello, M.A. (2002). Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 35, 1389-1394.
- Wanders, D., Graff, E.C., and Judd, R.L. (2012). Effects of high fat diet on GPR109A and GPR81 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 278-283.
- Wang, L., Dong, Y., Yu, X., Shanguan, D.H., Zhao, R., Han, H.W., and Liu, G.Q. (2002). Analysis of glucose and lactate in dialysate from hypothalamus of rats after exhausting swimming using microdialysis. *Biomed Chromatogr* 16, 427-431.
- Wang, L., Psilander, N., Tonkonogi, M., Ding, S., and Sahlin, K. (2009). Similar expression of oxidative genes after interval and continuous exercise. *Med Sci Sports Exerc* 41, 2136-2144.
- Waterson, M.J., and Horvath, T.L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab* 22, 962-970.
- Welberg, L. (2010). Metabolism: An appetite for exercise. *Nat Rev Neurosci* 11, 662.

Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F.J., Park, S.M., and Cai, D. (2011). Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol* 9, e1001112.