



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp

BÁRBARA DE ALMEIDA RODRIGUES

**PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGULAÇÃO DA PROTEÍNA MKP-3
EM HIPOTÁLAMO DE CAMUNDONGOS OBESOS: EFEITOS SOBRE A
SINALIZAÇÃO DA INSULINA**

**ROLE OF PHYSICAL EXERCISE IN THE REGULATION OF MKP-3
PROTEIN IN HYPOTHALAMIC OF OBESE MICE: EFFECTS ON INSULIN
SIGNALING**

**LIMEIRA
2017**

BÁRBARA DE ALMEIDA RODRIGUES

**PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGULAÇÃO DA PROTEÍNA MKP-3
EM HIPOTÁLAMO DE CAMUNDONGOS OBESOS: EFEITOS SOBRE A
SINALIZAÇÃO DA INSULINA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na Área de Metabolismo e Biologia Molecular.

ORIENTADOR: JOSÉ RODRIGO PAULI

CO-ORIENTADOR: LEANDRO PEREIRA DE MOURA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA BÁRBARA DE ALMEIDA
RODRIGUES, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. JOSÉ RODRIGO PAULI.

LIMEIRA

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/25512-4

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

R818p Rodrigues, Bárbara de Almeida, 1990-
Papel do exercício físico na regulação da proteína MKP-3 em hipotálamo de camundongos obesos : efeito sobre a sinalização da insulina / Bárbara de Almeida Rodrigues. – Limeira, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: José Rodrigo Pauli.

Coorientador: Leandro Pereira de Moura.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Proteína quinase 3 ativada por mitógeno. 3. Ingestão de alimentos. 4. Exercícios físicos. 5. Hipotálamo. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Moura, Leandro Pereira, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of physical exercise in the regulation of MKP-3 protein in hypothalamic of obese mammals : effects on insulin signaling

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Mitogen activated protein kinase 3

Food intake

Physical exercises

Hypothalamus

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

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

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Orientador]

Vânia D'Almeida

Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

André Rocardo Gomes de Proença

Leandro Fernandes

Data de defesa: 26-10-2017

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Banca examinadora

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli (Orientador)

Prof. Dr. André Ricardo Gomes de Proença

Profa. Dra. Vânia D'Almeida

Prof. Dr. Leandro Fernandes

Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Ata da defesa para obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

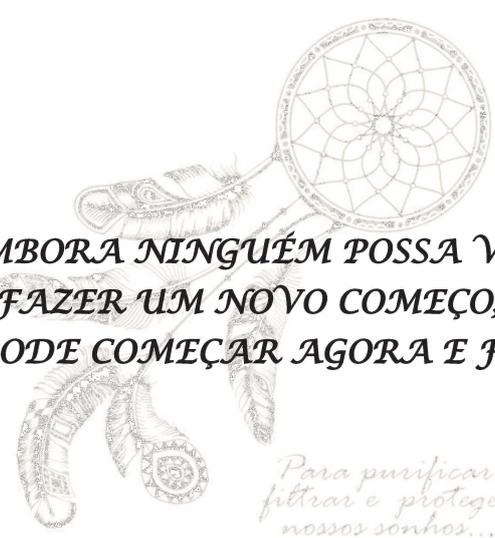
DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, a minha família, amigos, alunos, professores e todas as pessoas que fazem parte de minha vida, as quais de certa forma, me ajudaram a terminar mais uma etapa deste meu caminho. Elas que me deram a oportunidade de conhecer, aprender e explorar novos caminhos e conhecimentos nesta etapa da minha vida. Foram os ensinamentos e dedicação de todos que me fizeram ser uma pessoa cada vez mais forte e capaz de conquistar meus sonhos e objetivos na vida, com muita sabedoria, força, fé e coragem. Entretanto, não me esqueço de todos os profissionais e pessoas maravilhosas que passaram por minha vida, antes e durante a graduação e a pós-graduação (Mestrado, Doutorado), todos aqueles que de qualquer forma contribuíram para meu conhecimento e crescimento pessoal.

AGREDECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por cada dia proporcionado, pela coragem e força que tem me dado e por ter superado difíceis momentos de saúde neste período. Muitas coisas com ele aprendi, muitos valores eu guardei e muitas vitórias conquistei. Agradeço ao meu orientador Dr. José Rodrigo Pauli, pela ajuda, pela compreensão dos momentos mais complicados de minha saúde, pela atenção e dedicação. Um Professor, acima de tudo, uma pessoa que leva consigo um brilho incomparável. Agradeço também aos demais professores e pesquisadores da UNICAMP que diretamente ou indiretamente contribuíram para meu crescimento e meu conhecimento como profissional. Estes que, iluminados com tanta inteligência, abriram portas e ensinaram caminhos. Agradeço por todo conhecimento transmitido. Agradeço pela compreensão e ajuda nos momentos de maiores desesperos e confusões. Obrigada a cada um que, com seu jeito único e especial, me fizeram estar aqui completa e satisfeita. Agradeço profundamente aos alunos do Laboratório, pelo tempo dedicado para meu ensinamento e ajuda durante estes períodos. Foram pessoas extremamente essenciais para que hoje eu conclua mais esta etapa. Agradeço aos meus pais, namorado, familiares e amigos, os quais nunca me fizeram sentir só, que compartilharam momentos que estarão guardados para sempre, e que serei eternamente grata a cada um de vocês. Agradeço todos que fazem parte da minha vida, e que me fizeram suportar todas as dificuldades e limitações, mostrando realmente o quanto sou forte, podendo ir muito mais longe, depois de pensar que já estava em meu limite. Vocês estiveram presentes para me mostrar o quanto podia ir muito mais além de qualquer obstáculo que pudesse me atrapalhar. Obrigada por me ajudar a estar onde cheguei, e de conquistar meus sonhos. Serei para sempre grata por todos que estiveram comigo nestes anos de trabalho, luta, desafios e conquista. Obrigada!

EPÍGRAFE



**“EMBORA NINGUÉM POSSA VOLTAR ATRÁS E
FAZER UM NOVO COMEÇO, QUALQUER UM
PODE COMEÇAR AGORA E FAZER UM NOVO
FIM.”**

*Para purificar,
filtrar e proteger
nossos sonhos...* **CHICO XAVIER.**

RESUMO

A ação da insulina no hipotálamo é crucial para o controle da ingestão alimentar. No estado alimentado a insulina é secretada e atinge o hipotálamo fosforilando e extruindo do núcleo a proteína FoxO1 (fator de transcrição da família forkhead BOX O), diminuindo a transcrição de neuropeptídeos orexigênicos (NPY, neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao gene agouti, AgRP). Ao contrário, quando há prejuízos na transdução do sinal da insulina FoxO1 permanece no núcleo das células neuronais elevando a síntese de neuropeptídeos orexigênicos e com isso há o aumento da fome. Nesse contexto, a proteína MAPK-fosfatase-3 (MKP-3) tem a habilidade de desfosforilar FoxO1, permanecendo no núcleo, induzindo aumento de NPY e AgRP no hipotálamo e consequentemente causando hiperfagia e aumento da massa corporal adiposa. Portanto, ações terapêuticas capazes de ter efeito inibitório sobre a MKP-3 em células neurônais do hipotálamo podem se revelar como importantes agentes contra a obesidade e co-morbidades. O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do exercício físico sobre o conteúdo proteico de MKP-3 e sinalização da insulina em hipotálamo de camundongos obesos induzidos por dieta rica em gordura saturada. Foram utilizados camundongos Swiss distribuídos em grupos: Controle, alimentados com uma ração padrão para roedores, Obesos (OB), alimentados com dieta rica em gordura saturada e Obesos exercitados agudamente (OBEXE). Após as análises de composição corpórea e ingestão alimentar, foram identificadas as proteínas de interesse da cascata de sinalização de insulina através da técnica de *Western Blot*. Foram também realizados ensaios com células HEK293 e camundongos Swiss controle com e sem administração de adenovírus para superexpressar MKP-3 e avaliar os efeitos sobre a ingestão alimentar e fosforilação de FoxO1. Para identificar a ação da fosfatase MKP-3 em desfosforilar FoxO1 foi utilizado células HEK293 tratadas ou não com insulina e um vetor adenoviral de MKP-3 e GFP (controle) injetado intracerebroventricular (i.c.v) em camundongos, após os tratamentos as análises moleculares foram feita através da técnica de *Western Blot*. Verifica-se através dos resultados que a obesidade aumentou o conteúdo proteico de MKP-3 no hipotálamo e isso foi acompanhado por aumento na ingestão alimentar e adiposidade corporal dos camundongos. Os experimentos com adenovírus mostraram que a super expressão de MKP-3 causa a desfosforilação da FoxO1 e prejuízo no controle da fome estimulado por insulina. Entretanto, foi observado aumento do exercício físico sobre a proteína MKP-3 hipotalâmica. Concluiu-se que a condição de obesidade está associada com aumento nos níveis de MKP-3 no hipotálamo e isso está associado com hiperfagia. O exercício físico não foi capaz de inibir a atividade desta proteína em desfosforilar o fator transcricional FoxO1 no hipotálamo. Intervenções capazes de inibir a MKP-3 podem se tornar estratégias relevantes no tratamento da obesidade.

Palavras-chave: Obesidade, MKP-3, Ingestão de Alimentos, Exercício Físico e Hipotálamo.

ABSTRACT

The insulin action in the hypothalamus is crucial for the food intake control. On fed state the insulin is secreted and reaches the hypothalamus which phosphorylates and extracts the FoxO1 protein (transcription factor of the forkhead BOX O family) of the nucleus, decreasing the transcription of orexigenic neuropeptides (NPY, neuropeptide Y, and peptide related to the agouti gene, AgRP). Conversely, when there is impairment in the insulin transduction signal the FoxO1 remains in the nucleus of the neuronal cells, elevating the synthesis of orexigenic neuropeptides, taking to the increased hunger. In this context, the MAPK-phosphatase-3 (MKP-3) protein has the ability to dephosphorylate FoxO1, remaining in the nucleus, inducing increase of NPY and AgRP in the hypothalamus and consequently causing hyperphagia and increase of adipose body mass. Therefore, therapeutic actions capable of having an inhibitory effect on MKP-3 in neuronal cells of the hypothalamus can be shown as important agents against obesity and comorbidities. The objective of the present study was to verify the physical exercise effects on the MKP-3 protein content and insulin signaling in the obese mice hypothalamus induced by diet rich in saturated fat. Swiss mice were distributed in groups : control, fed with a standard ration for rodents, obese (OB), fed with high fat diet and obese exercised acutely (OBEXE). After analysis of body composition and food intake, were identified the proteins of interest of the insulin signaling cascade through the Western Blot technique. Assays were also performed with HEK293 cells in Swiss control mice with or not adenovirus administration to overexpress MKP-3 and to evaluate the effects on food intake and phosphorylation of the FoxO1. To identify the MKP-3 phosphatase action on FoxO1 dephosphorylation, we used HEK293 cells treated or not with insulin and an adenoviral vector of MKP-3 and GFP (control) injected intracerebroventricular (icv) in mice. After the treatments the molecular analyzes were done through the Western Blot technique. It is verified through the results that obesity increased the proteic content of MKP-3 in the hypothalamus and this was accompanied by an increase of food intake and body adiposity of the camundongos. The adenoviruses experiments showed that the overexpression of MKP-3 causes FoxO1 dephosphorylation and impairment on hunger control stimulated by insulin. However, an increase in physical exercise was observed on the hypothalamic MKP-3 protein. We conclude that the obesity condition is associated with an increase in MKP-3 levels in the hypothalamus and this is associated with hyperphagia. Physical exercise was not able to inhibit the activity of this protein on desphosphorylating the FoxO1 transcriptional factor in the hypothalamus. Capable Interventions of inhibiting the MKP-3 can become relevant strategies on the obesity treatment.

Key words: Obesity, MKP-3, Food Intake, Exercise and Hypothalamus.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP - peptídeo relacionado ao gene agouti. Neuropeptídeo que estimula a ingestão.

AIN - American Institute of Nutrition.

Akt (Proteína Kinase B/Akt) – Proteína quinase B.

Camundongo ob/ob - Camundongo obeso que apresenta mutação no gene que codifica o a leptina.

Camundongos db/db – Camundongo obeso que apresenta mutação no gene que codifica o receptor de leptina.

CART - transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina.

CRH - hormônio liberador de corticotrofina.

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium.

DUSP6 - Proteína fosfatase de especificidade dual 6.

EGFP (Enhanced green fluorescent protein) – Proteína fluorescente verde melhorada.

FoxO1 - fator de transcrição da família forkhead BOX O.

G-6-Pase - Glicose-6-fosfatase

HEK (Human Embryonic Kidney 293cells) - Células 293 originalmente composta por células de rim.

HFD (High fat diet) - Dieta rica em gordura saturada.

HL - Hipotálamo lateral.

I.C.V - Intracerebroventricular.

IKK - I kappa kinase.

IL-1 β - interleucina-1 β .

IL-6 - interleucina-6.

iNOS - óxido nítrico sintase induzível.

IR - Receptor de insulina.

IRSs - substratos do receptor de insulina.

JNK - c-jun N terminal quinase.

Kitt - Teste de tolerância à insulina.

LPS - lipopolissacarídeos

MCH - Hormônio concentrador de melanina.

MKP-3 - MAPK-fosfatase-3.

NF- κ B - factor nuclear kappa B.

NPY - neuropeptídeo Y.

PKD1 - proteína quinase dependente de fosfoinositol-3.

PEPCK - Fosfoenol piruvato carboxiquinase.

pERK - Quinase reguladas por sinal extracelular.

PI3q - fosfatidilinositol-3-quinase.

PIP2 - fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.

PIP3 - fosfatidilinositol-3,4,5trifosfato.

POMC - pro-opio melanocortina.

PTP1B - indução da proteína fosfatase 1B.

PVN - Núcleo paraventricular do Hipotálamo.

SFAs - ácidos graxos saturados de cadeia longa.

SFB - Soro Fetal Bovino

SNC - Sistema nervoso central

SOCS3 - proteína supressora da sinalização de citocinas.

TNF-Alpha - Fator de necrose tumoral alpha.

TRB3 - Mammalian Homolog of Drosophila Tribbles 3.

TSH - hormônio liberador de tireotrofina.

α -MSH - hormônio alfa-melanócito estimulador .

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1. Regulação da ingestão alimentar e interação neuroendócrina..... | 17 |
| 2.2. Obesidade e disfunção hipotalâmica..... | 21 |
| 2.3. Proteína MAPK fosfatase 3 e interação MKP-3/substrato..... | 25 |
| 2.4. Papel do exercício físico na redução da inflamação e controle da ingestão alimentar..... | 27 |
| 3. OBJETIVOS..... | 31 |
| 3.1. Objetivos Gerais..... | 31 |
| 3.2. Objetivos Específicos..... | 31 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 5. RESULTADOS..... | 43 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 58 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 66 |

1. INTRODUÇÃO

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da homeostase energética é um elemento-chave na compreensão da fisiopatologia da obesidade, cuja prevalência atingiu proporções preocupantes em todo o mundo ao longo das últimas quatro décadas (OMS, 2016). O aumento da massa adiposa corpórea caracteriza a obesidade e resulta decisivamente no desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético e está intimamente relacionada com fatores genéticos e ambientais, como aumento da ingestão de alimentos ricos em gordura saturada e na redução da atividade física. Ambos os fatores levam ao desequilíbrio energético e, conseqüentemente, à obesidade, pois modulam as finas comunicações altamente integradas e coordenadas presentes no Sistema Nervoso Central (SNC) (ATKINSON; EISENBARTH., 2001; HOSSAIN et al., 2007).

Estudos demonstram que o consumo de dieta rica em gordura saturada e hipercalóricas promove resistência aos hormônios insulina e à leptina no sistema nervoso central, suprimindo os efeitos anorexígenos desses hormônios no hipotálamo (CARVALHEIRA et al., 2003; CARVALHEIRA et al., 2005; FLORES et al., 2006; PICARDI et al., 2008). Esta disfunção hipotalâmica aos efeitos da insulina, por consequência, causa uma progressiva perda do balanço entre ingestão alimentar e termogênese, resultando em ganho excessivo de gordura corpórea. O prejuízo na via de transmissão do sinal da insulina em condição de obesidade induz aumento na expressão de fator de transcrição da família de forkhead FOX O (FoxO1) no núcleo de neurônios hipotalâmicos responsáveis pelo controle da fome e hiperfagia (DE SOUZA et al., 2005; FLORES et al., 2006; PICARDI et al., 2008; MORAES et al., 2009; MILANSKI et al., 2009; PICARDI et al., 2010). Ao contrário, em resposta ao sinal da insulina, há um aumento significativo na expressão de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3q), fosforilação de Akt e isso culmina na fosforilação e extrusão do núcleo celular da proteína FoxO1 no hipotálamo. FoxO1 promove a transcrição de neuropeptídeos orexigênicos como Neuropeptídeo Y (NPY) e do peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) estimulando a fome.

Sabidamente, além da insulina a leptina também tem papel relevante sobre o processo de controle da fome. Conjuntamente a ação desses dois hormônios permite que ocorra um controle fino do consumo de calorias. Quando ocorre a sinalização da leptina no hipotálamo, o desfecho final é o aumento na transcrição de neuropeptídeos

anorexigênicos como a pró-opio melanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART), com efeitos inibitórios sobre a fome. Como o presente trabalho investigou mecanismo de interação relacionado à disfunção da sinalização da insulina, será dada mais ênfase à via molecular da insulina.

O desarranjo na funcionalidade da insulina no hipotálamo tem sido atrelado à ativação de proteínas intracelulares de ação pró-inflamatórias em resposta ao consumo de dieta rica em gordura e desenvolvimento de obesidade, com prejuízos moleculares na transdução do sinal deste hormônio (CARVALHEIRA et al., 2003; CARVALHEIRA et al., 2005). Tem sido propostos alguns mecanismos que levam a prejuízos nesse processo, como a indução da expressão da proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS3), a ativação de serinas quinases como a *c-jun N terminal quinase* (JNK) e *I kappa quinase* (IKK), a indução da proteína fosfatase 1B (PTP1B), e também da participação da proteína *Mammalian Homolog of Drosophila Tribbles 3* (TRB3) (DE SOUZA et al., 2005; CARVALHEIRA et al., 2003; CARVALHEIRA et al., 2005; PICARDI et al., 2008; MORAES et al., 2009). Tais proteínas apresentam efeito negativo sobre os sinais moleculares da insulina, por mecanismos distintos, provocando prejuízo da percepção central dos estoques periféricos de energia, o que acarreta em controle precário da ingestão alimentar e do gasto energético. Por outro lado, quando estas proteínas foram inibidas farmacologicamente ou nocauteadas em animais expostos à dieta rica em gordura, tiveram os efeitos negativos por elas induzidos, significativamente atenuados (CARVALHEIRA et al., 2003; DE SOUZA et al., 2005; PICARDI et al., 2008; MORAES et al., 2009; MILANSKI et al., 2009; PICARDI et al., 2010).

Contudo, parece que a disfunção hipotalâmica na obesidade não está atrelada apenas às proteínas supracitadas, podendo haver outras possíveis candidatas com potencial efeito negativo sobre a via de sinalização da insulina no hipotálamo. Dentre estas, a MAPK fosfatase-3 (MKP-3) tem sido descrita como uma das principais ativadoras da FoxO1 por sua afinidade em desfosforilar esta proteína (XU et al., 2005; WU et al., 2010; JIAO et al., 2012., PAULI et al., 2014; FENG et al., 2012). Já foi previamente descrito na literatura que o conteúdo de MKP-3 se encontra aumentado no tecido hepático de roedores em condição de obesidade, resultando na desfosforilação e permanência da FoxO1 no compartimento nuclear e consequente aumento da produção hepática de glicose (XU et al., 2005; WU et al., 2010; JIAO et al., 2012., PAULI et al., 2014). Já que a FoxO1 no núcleo participa da transcrição de enzimas cruciais da via da

gliconeogênese hepática como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6-fosfatase (G6Pase). Entretanto estes mecanismos de interação entre MKP-3 com FoxO1 ainda não foram investigados a nível do Sistema Nervoso Central, em especial no hipotálamo, em condição de obesidade.

É claro na literatura que ações terapêuticas contra a obesidade e resistência à insulina são relevantes para o combate e a proteção destas doenças. Estudo preliminar em nosso laboratório mostrara que o exercício físico exerce potente atividade anti-inflamatória, restabelecendo o controle da fome em animais obesos (ROPELLE et al., 2010). Tem sido demonstrado também que o exercício físico é capaz de modular a fosforilação de FoxO1 em tecido hepático e hipotalâmico (ROPELLE et al., 2010; DE SOUZA et al., 2010). No entanto, ainda são desconhecidos os efeitos do exercício sobre a proteína MKP-3 no sistema nervoso central. Então, o entendimento do papel do exercício físico sobre a regulação da MKP-3 no hipotálamo e controle da fome se tornam relevantes no combate da obesidade. Além disso, o entendimento da função da MKP-3 no hipotálamo pode abrir portas para novas ações terapêuticas na disfunção hipotalâmica e hiperfagia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR E INTERAÇÃO NEUROENDÓCRINA

Nas últimas duas décadas houve aumento surpreendente do conhecimento científico a respeito dos fenômenos que participam do controle neural da fome e da termogênese (WYNNE et al., 2005; CINTRA et al., 2007; STANLEY et al., 2005; WOODS et al., 1998; BERTHOUD, 2006; COPPARI et al., 2009). O hipotálamo é a região essencial do sistema nervoso central que regula a ingestão alimentar e o balanço energético (STANLEY et al., 2005; WOODS et al., 1998; BERTHOUD, 2006). No hipotálamo existem duas importantes vias neurais (lateral e ventromedial) que regulam o comportamento metabólico a partir da atividade endócrina, autonômica e do controle do dispêndio e armazenamento de energia de forma integrada e coordenada (WOODS et al., 1998). Tanto em modelos animais como em humanos, o centro hipotalâmico lateral é responsável pela regulação da alimentação e o centro hipotalâmico ventromedial é responsável pela saciedade. Estudos em modelos animais demonstram que lesões hipotalâmicas na região lateral do hipotálamo promovem redução da ingestão alimentar e apresentam quadro de afagia. Por outro lado, lesões no núcleo ventromedial provocam um quadro de obesidade, hiperfagia e diminuição da atividade simpática (STANLEY et al., 2005).

No hipotálamo estão presentes dois grandes grupos de neurônios envolvidos na regulação da ingestão alimentar. São eles: neurônios produtores dos neuropeptídeos NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (peptídeo relacionado ao gene agouti), ambos orexigênicos responsáveis por estimular a ingestão alimentar, e neurônios produtores dos neuropeptídeos POMC e CART, que tem ação anorexigênica e reduzem a ingestão alimentar (DATE et al., 2002).

A ação dos hormônios que potencializam o efeito anorexígeno no SNC ocorre a partir da ativação de neurônios no núcleo arqueado hipotalâmico que expressam a POMC e promovem a síntese do hormônio alfa-melanócito estimulador (α -MSH). Este se liga aos receptores melanocortina 4 promovendo a redução da ingestão alimentar (GRILL., 2006). O aumento da expressão do CART no núcleo arqueado também é responsável pela inibição da ingestão alimentar. Por outro lado, os hormônios que potencializam o efeito orexigênico contribuem com o balanço energético positivo por

aumentar a expressão dos neurônios NPY/AgRP que antagonizam os efeitos da POMC e do CART.

Este antagonismo está relacionado à inibição dos neurônios do núcleo paraventricular, que expressam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) com função anorexígena, contrariamente, a área hipotalâmica lateral expressa a orexina que exerce a função orexigênica (GRILL., 2006). Assim, há aumento da resposta excitatória para os neurônios NPY/AgRP e inibição de neurônios POMC/CART. O ponto de partida para tais avanços foi a descoberta do hormônio leptina e posteriormente de suas ações no sistema nervoso central (WYNNE et al., 2005; CINTRA et al., 2007).

A leptina é produzida pelo tecido adiposo branco em quantidade proporcional ao conteúdo de massa adiposa. A leptina apresenta receptores ObRb de cadeia longa (maior quantidade de aminoácidos) com maior expressão no núcleo arqueado do hipotálamo, mais precisamente no hipotálamo ventromedial e dorsomedial, na área hipotalâmica lateral e na área pré-óptica medial.(FRUHBECK et al., 2006; MUNZBERG et al., 2005). Sua função é aumentar a expressão dos neurônios anorexígenos POMC/CART, conseqüentemente, antagoniza a atividade dos neurônios orexígenos NPY/AgRP (SCHWARTZ et al., 2000).

Estas evidências fundamentam que os efeitos da leptina sobre o balanço energético são mediados por neurônios desta região, que suprimem a ingestão alimentar e controlam o gasto energético. Estes neurônios além de expressarem receptores para leptina, também expressam receptores para insulina.

A insulina é um polipeptídeo com massa molecular de 5,8kDa produzido pelas células beta pancreáticas nas ilhotas de Langerhans, com importante efeito na modulação da fome no hipotálamo (CARVALHEIRA et al., 2001). O aumento do tecido adiposo pode ser um determinante para desencadear a resistência à insulina (TORSONI et al., 2003). Este hormônio apresenta receptores específicos no fígado, no músculo, no tecido adiposo, e no Sistema Nervoso Central (SNC). Estudos mostram a insulina como um potente sinalizador anorexigênico no SNC promovendo a redução da expressão dos genes hipotalâmicos que regulam a fome e termogênese. No hipotálamo, a insulina apresenta receptores específicos no núcleo arqueado, e nas regiões dorsomedial e paraventricular hipotalâmica (MARKS et al., 1990).

A insulina promove seus efeitos através de um mecanismo de sinalização celular que inicia com a sua ligação ao seu receptor de membrana, denominado receptor de insulina (IR), que possui atividade tirosina quinase intrínseca, capaz de se auto

fosforilar e fosforilar e ativar substratos adjacentes que permitem que os efeitos biológicos deste hormônio aconteçam. Estes receptores recrutam várias moléculas intracelulares envolvidas no processo de transdução. Entre elas estão os substratos proteicos dos receptores de insulina (IRS) que são fosforilados em resíduos de tirosina pelos receptores ativos de insulina. Este evento permite que o IRS ative a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q) que aumenta a produção do fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP3) a partir do recrutamento de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). A forma ativa da PIP3 ativa a proteína quinase dependente de fosfoinositol-3 (PDK1) que ativa a proteína Akt, que por sua vez fosforila e inibe o fator de transcrição FoxO1. (BRUNING et al., 2000) (Figura 1).

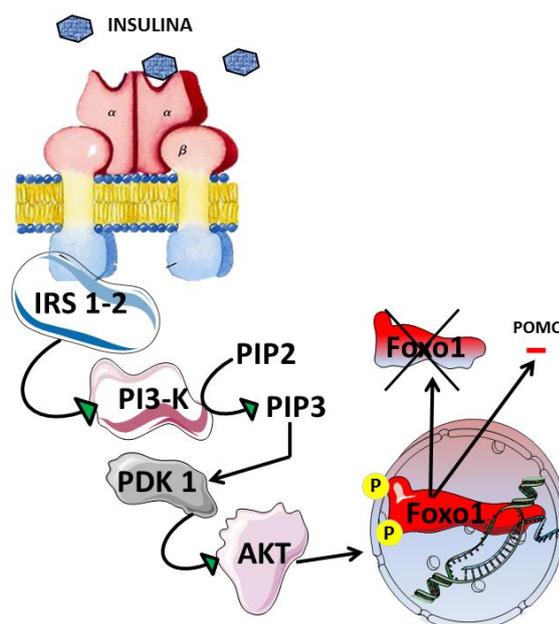


Figura 1. Desenho esquemático do neurocircuito hipotalâmico da ação da insulina. Após a ligação da insulina ao seu receptor, ocorre a ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q) a partir da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) que aumenta a atividade do fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que ativa a proteína quinase dependente de fosfoinositol-3 (PDK1), conduzindo a fosforilação da Akt. A Akt então fosforila o fator de transcrição da família forkhead BOX O (FoxO1) no núcleo levando a sua extrusão e redução da expressão de neuropeptídeos orexigênicos e atenuando a atividade dos neuropeptídeos anorexigênicos como a pro-opio melanocortina (POMC).

Estudos apresentam que a leptina e a insulina agindo de maneira combinada, têm maior capacidade de inibir neurônios NPY/AgRPérgicos e ativar neurônios POMC/CARTérgicos (CARVALHEIRA et al., 2001; TORSONI et al., 2003; CARVALHEIRA et al., 2005). Em caso de redução de massa adiposa, como ocorre no

emagrecimento por exemplo, neurônios NPY/AgRPérgicos encontram-se ativados. Para esta resposta neurônios do núcleo arqueado se comunicam com neurônios de segunda ordem presentes no núcleo paraventricular (PVN) e lateral do hipotálamo (HL) através de projeções axonais. Estas projeções resultam em inibição da produção de neurotransmissores anorexigênicos e ativadores da termogênese como o hormônio liberador de tireotrofina (TSH) e o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular, e ativação da produção de neurotransmissores orexigênicos e inibidores da termogênese (orexina e MCH) no núcleo hipotalâmico lateral (WYNNE et al., 2005; CINTRA et al., 2007), resultando em aumento da fome e a redução da termogênese.

Opostamente, na condição pós-prandial, é observado níveis aumentados de insulina e leptina no sangue indicando que há energia suficiente no organismo e no tecido adiposo, o que induz inibição dos neurônios NPY/AgRPérgicos e ao estímulo dos neurônios POMC/CARTérgicos, resultando na inibição de neurônios do núcleo hipotalâmico lateral, produtores de orexina e MCH e estímulo de neurônios do núcleo paraventricular, produtores de CRH e TSH (WYNNE et al., 2005; CINTRA et al., 2007). Nesta situação observa-se saciedade acompanhada de aumento da termogênese (FLIER et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2000).

Por este motivo, é importante ressaltar que tanto a leptina como a insulina desempenha ações indispensáveis na modulação da saciedade. No entanto, novas descobertas evidenciam que diferentes proteínas da via de sinalização da insulina têm ações importantes no controle central da fome. Sendo assim, o sinal da insulina leva a fosforilação da FoxO1 e sua exclusão nuclear com posterior degradação proteossômica, como consequência redução de sua ação. Sabe-se que a FoxO1 modula as ações metabólicas da insulina, incluindo gliconeogênese, oferta de glicose ao músculo esquelético, diferenciação dos adipócitos e crescimento da célula β pancreática (PUIGSERVER et al., 2003; KITAMURA et al., 2002). Além dos efeitos periféricos, a FoxO1 regula a sinalização da insulina no hipotálamo e gordura corporal controlando os dois circuitos.

Em estudo prévio (KIM, 2006), um grupo de pesquisadores demonstrou que a ativação da FoxO1 no núcleo arqueado do hipotálamo aumenta a ingestão alimentar e diminui o dispêndio energético. Ambas as mudanças conduzem ao aumento da massa corporal. Ao contrário, a inibição central da FoxO1 reduz a ingestão alimentar e a massa corporal. Notavelmente, os efeitos anorexigênicos da insulina e leptina foram

significativamente diminuídos quando a Foxo1 hipotalâmica foi ativada. A FoxO1 promove tais modificações fisiológicas, pois estimula a transcrição dos chamados neuropeptídeos orexigênicos o NPY e AgRP através da via de sinalização da PI3q mas, suprime a transcrição anorexígena da POMC pela ação antagonista a atividade do sinal da STAT3, estes dados sugerem que a supressão na atividade da FoxO1 hipotalâmica é requerida para a indução de anorexia da insulina e leptina, estabelecendo uma via de sinalização através da qual a insulina e leptina atuam em neurônios hipotalâmicos para o controle da ingestão alimentar (KIM, 2006).

Assim fica evidente que existe um complexo mecanismo de controle central da saciedade, e ao que tudo indica, esse controle vai além das proteínas iniciais da cascata de sinalização da insulina e leptina, sugerindo-se que, vias distais também exercem papel chave na modulação da fome. Tal compreensão tem despertado o interesse de muitos pesquisadores a respeito de possíveis mecanismos de resistência hipotalâmica à sinalização da insulina e leptina como participantes da gênese da obesidade.

2.2.OBESIDADE E DISFUNÇÃO HIPOTALÂMICA

A prevalência da obesidade, no contexto de excesso de dieta rica em gordura e estilo de vida sedentário, tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas, sendo alarmante a estimativa de adultos e crianças com obesidade e sobrepeso em todo o mundo. Tem sido identificado que modelos animais de obesidade resultante tanto de defeitos genéticos, como camundongos ob/ob (portador de mutação no gene da leptina) ou db/db (portador de mutação no gene do receptor de leptina), ou em animais obesos por ingestão de dietas hipercalóricas, que a ação hipotalâmica da insulina e da leptina fica consideravelmente comprometida (PICARDI et al., 2008; MORAES et al., 2009). Sabe-se que tais disfunções são provenientes da inflamação de baixo grau presente nos indivíduos com excesso de gordura corporal.

Para o melhor entendimento entre obesidade e inflamação, estudos observaram que a hipertrofia dos adipócitos desencadeiam uma série de alterações no tecido adiposo que resultam na infiltração de macrófagos e, conseqüentemente, secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias e está diretamente relacionada às alterações metabólicas decorrentes da obesidade com o desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes tipo 2 (WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2003).

A inflamação metabólica induzida pela dieta rica em gordura saturada no hipotálamo, marcadamente aumentada pela transcrição de citocinas inflamatórias, pode ser observada a partir de 72 horas após o início desta. Conseqüentemente ao longo dos dias ocorre hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo branco culminando em hiperfagia crônica induzido por dieta hiperlipídica (ENRIORI et al., 2007; THALER et al., 2012). Portanto, a inflamação hipotalâmica induzida por dieta rica em gordura, precede o aparecimento de obesidade e ocorre muito mais cedo do que na inflamação ou distúrbios metabólicos nos tecidos periféricos. Esta primazia sugere que a inflamação hipotalâmica desempenha um papel agudo na modulação do metabolismo normal e no início de mecanismos fisiopatológico associados à obesidade.

A progressão do processo inflamatório sabidamente prejudica a sinalização de hormônios como leptina e insulina, e mais que isso, se mostra capaz de ativar vias, proteínas pró-inflamatórias e mecanismos pró-apoptóticos. No estudo de De Souza e colaboradores (2005), feito com animais obesos induzidos por dieta rica em gordura relatou o aumento significativo da expressão de proteínas pró-inflamatórias, como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), fenômeno acompanhado pela ativação de biomarcadores envolvidos na disfunção hipotalâmica. Através da investigação de mais de 1000 genes no hipotálamo destes animais, foi identificado que aproximadamente 15% dos genes avaliados tinham sua expressão modulada pela ingestão de uma dieta rica em gordura. Curiosamente, uma parcela desses genes era composta por reguladores ou efetores da resposta imune, entre elas uma série de citocinas pró-inflamatórias, entre elas quinases sensíveis á inflamação, como a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e a quinase do inibidor do NF-B (IKK).

No hipotálamo estas citocinas com função serina quinase, inativam alguns relevantes mediadores das respostas anorexígenas da insulina, colaborando assim para a instalação da resistência a esse hormônio (CARVALHEIRA et al., 2003; FLORES et al., 2006).

A JNK e a IKK causam a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRSs) em serina 307 com efeito negativo na via de sinalização da insulina. Além disso, essas vias levam a produção de outros mediadores inflamatórios através do controle da transcrição gênica. A ativação da IKK provoca a degradação do I κ B e a dissociação do complexo I κ B/NF- κ B. Este último migra para o núcleo onde participa da transcrição gênica de proteínas inflamatórias como TNF- α , interleucinas 6 e 1 β (IL-6 e IL-1 β),

óxido nítrico sintase induzível (iNOS), entre outras. (CINTRA et al., 2012; MILANSKI et al., 2009; WELLEN et al., 2003; DE SOUZA et al., 2005).

Comprovado por outro estudo, a administração aguda de ácidos graxos saturados de cadeia longa (SFAs), diretamente no terceiro ventrículo de camundongos, aumentou a atividade de NF- κ B (ativador nuclear de células B ativadas), um importante ativador transcricional da inflamação que é suficiente para induzir a apoptose dos neurônios hipotalâmicos (MORAES et al., 2009), isso indica que os fatores inflamatórios podem desempenhar um papel na promoção da morte neuronal no contexto da alimentação hiperlipídica celular, em resposta a patologias moleculares pró-inflamatórias, no hipotálamo (MILANSKI et al., 2009).

Outro mecanismo pelo qual a insulina tem seu efeito reduzido é pela indução de proteínas como a SOCS3 e PTP1B. Evidências preliminares verificam maior expressão da proteína SOCS3 em animais obesos (MORAES et al., 2009; DE SOUZA et al., 2005; LIU et al., 2011). Pertencentes a uma família de reguladores da ação de citocinas, sinais provenientes de receptores de citocinas levam a indução da expressão do gene da SOCS3. A SOCS3 atua como bloqueador físico dos sinais gerados, ao se ligar a sítios funcionalmente ativos dos receptores da insulina. Algumas proteínas citoplasmáticas como os IRS-1 e IRS-2, que participam da via de sinalização da insulina, podem ser ligadas a SOCS3 e assim direcionadas para a degradação proteossômica, o que diminui a quantidade de intermediários das vias de sinalização, reduzindo a propagação do sinal emitido inicialmente pela insulina.

Dentre as fosfatases, a proteína PTP1B cataliza a retirada de grupos fosfato de resíduos de tirosina quinase presentes em vários intermediários das vias de sinalização da insulina (PICARDI et al., 2010). Portanto, ao desfosforilar tais proteínas, a PTP1B as torna inativas. Muitos estudos mostram que esta proteína está envolvida na sinalização da insulina através da desfosforilação em tirosina do IR e IRSs, conseqüentemente, na terminação do sinal (PICARDI et al., 2010; CHIARREOTTO-ROPELLE et al., 2013; ROPELLE et al., 2006).

A maioria dessas evidências originou-se de fenótipos de camundongos nocaute da PTP1B (SCHWARTZ et al., 2000). Assim como a inibição da PTP1B com oligonucleotídeo antisense em hipotálamo de animais obesos induzidos por dieta rica em gordura protegem dos efeitos deletérios desta proteína na obesidade (PICARDI et al., 2010). Portanto, existem diversos mecanismos com participação de inúmeras biomoléculas que exercem efeitos negativos na ação da insulina no hipotálamo através

de suas ações em proteínas proximais da cascata de sinalização (ROPELLE et al., 2010; DE SOUZA et al., 2010; PAULI et al., 2014).

Descobertas mais recentes demonstram outra proteína capaz de atuar mais distalmente sobre a via de sinalização da insulina. A *Mammalian Homolog of Drosophila Tribbles 3* (TRB3) é capaz de atuar negativamente sobre a proteína Akt quando produzida em excesso (FLAMMENT et al., 2012; MONTANE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015). Portanto, a TRB3 ao se ligar fisicamente com a proteína Akt é capaz de diminuir a ação da insulina e seus efeitos biológicos no organismo, incluindo o controle da ingestão alimentar (OZCAN et al., 2004; RODRIGUES et al., 2015). Recentemente estudada no hipotálamo a proteína TRB3 tem sido considerada outra molécula envolvida em inúmeros processos biológicos, com efeitos sobre a sinalização da insulina (DU et al., 2003), sendo, portanto, uma proteína envolvida com repostas metabólicas do organismo e tem sua expressão aumentada na condição de obesidade (OHOKA et al., 2005; HOTAMISLIGIL et al., 2010).

A dieta rica em gordura saturada induz uma rápida resposta pró-inflamatória no hipotálamo, independente do ganho de massa corpórea, e esta também pode persistir mesmo após a perda de excesso de peso corpóreo. Curiosamente, de acordo com a natureza persistente da inflamação hipotalâmica que é induzida pela ingestão de dieta rica em gordura saturada, as evidências mostram que a recuperação da função hipotalâmica é lenta, ou seja, não é reversível até que os ratos alimentados cronicamente com esta dieta retornem a uma dieta pobre em gordura durante 20 semanas (JOSHUA et al., 2012). Esta inflamação hipotalâmica e metabólica induzida pela dieta ocorre simultaneamente com sua disfunção. Entretanto, o consumo de dietas ricas especificamente em ácidos graxos saturados, leva à ativação de apoptose em neurônios do hipotálamo, comprometendo talvez, de forma permanente, o mecanismo de controle da ingestão alimentar e gasto energético (MORAES et al., 2009). É importante observar que, os trabalhos em modelos de roedores, indicam que as estratégias destinadas a melhorar a inflamação hipotalâmica induzida pela dieta podem ter potencial de prevenir doenças metabólicas (BI et al., 2005; CHIARREOTTO-ROPELLE et al., 2013. ROPELLE et al., 2010).

A disfunção hipotalâmica na obesidade não está atrelada apenas às proteínas supracitadas, podendo haver outras possíveis candidatas com potencial efeito negativo sobre a via de sinalização da insulina no hipotálamo, como também, com ações diferenciadas e em diferentes etapas dos eventos moleculares desencadeados pelos

hormônios. Dentre as proteínas candidatas, a MAP-quinase fosfatase 3 (MKP-3), que é também conhecida como *Dual specificity phosphatase 6* (DUSP6), pertencente à família de proteínas fosfatases. Estas inativam membros da proteína ativada por mitogénio (MAP) membros da família quinase (ERK, JNK, p38) por desfosforilação (CAMPS et al., 2000; DICKINSON et al., 2006). MKP-3 desfosforila especificamente quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) para atenuar a sinalização da MAP-quinase. (FJELD et al., 2000; ZHAO et al., 2001; MAILLET et al., 2008).

Já estudado em tecidos periféricos, por exemplo, em células de tecido hepático de animais obesos há um aumento na expressão de MKP-3 acompanhado por um aumento na desfosforilação da FoxO1 e conseqüentemente da sua maior atividade nuclear em células de tecido hepático. Como resultado os animais obesos apresentaram maior produção hepática de glicose e hiperglicemia quando comparados aos controles magros (WU et al., 2010). MKP-3 interage com FoxO1 e impede que ela seja fosforilada pela insulina e assim translocada do núcleo para posterior degradação. (WU et al., 2010). Sendo assim, mecanismos de ação de efeito inibitório sobre a MKP-3 se mostram promissores no combate a obesidade e disfunções metabólicas.

2.3. PROTEÍNA MAPK FOSFATASE 3 E INTERAÇÃO MKP-3/SUBSTRATO

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são proteínas que compoem um caminho de transdução de sinal altamente conservado. As quais são responsáveis por responder à diversas respostas fisiológicas e patológicas em uma ampla variedade de estímulos extracelulares e intracelulares (WIDMANN et al., 1999). Estas Ser/Thr quinases regulam processos como expressão gênica, tradução de proteínas, estabilidade protéica, localização de proteínas e atividade enzimática, interferindo até mesmo em diversas respostas celulares finais como: proliferação celular, diferenciação, sobrevivência celular e morte celular (WADA; PENNINGER., 2004).

Além destas funções, as MAPKs também desempenham papéis fundamentais em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo embriogênese, imunidade inata e adaptativa, homeostasia metabólica, função cardíaca e plasticidade neuronal, e que irregularidades na sinalização desta via, estão associadas á incluindo obesidade, diabetes, distúrbios neurodegenerativos e câncer (KYRIAKIS; AVRUCH., 2012; LAWRENCE et al., 2008)

As MKPs são uma subfamília distinta dentro de um outro grupo maior de proteínas fosfatases. Estes incluem as chamadas DUSPs "atípicas", que têm uma relação bastante definida e complexa com a ativação das MAP quinases, sendo importante por mediar a regulação positiva e negativa desses caminhos (PATTERSON et al., 2009). Existem proteínas MKP cataliticamente ativas em células de mamíferos, que se diferem em sua forma e função. Sendo que todas elas compartilham uma estrutura comum que consiste em um domínio não catalítico N-terminal e um domínio catalítico C-terminal, este último domínio, intercede a capacidade da fosfatase em reconhecer e regular isoformas MAP quinases específicas (DICKINSON; KEYSE., 2006). Diferentes membros da família destas fosfatases mostram diferentes especificidades de substratos, diferente distribuição em tecidos e localização celular, assim como diferentes modos de indutibilidade de sua expressão.

Diante do exposto, estudo com a proteína MKP-3 mostra que a proteína FoxO1 também é substrato intracelular desta proteína. A MKP-3 é capaz de desfosforilar a FoxO1 em Ser 256, inibindo sua extrusão do núcleo em hepatócitos (WU et al., 2010). Estudo demonstrou que animais obesos induzidos por dieta rica em gordura apresentam um aumento significativo na expressão de MKP-3 em células hepáticas quando comparados a seus pares magros (WU et al., 2010). Uma vez desfosforilada pela MKP-3 a FoxO1 permanece no núcleo e transcreve genes gliconeogênicos como a fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G-6-Pase). Assim, a superexpressão de MKP-3 diminui a fosforilação da FoxO1 estimulada por insulina. Nesse estudo, notou-se também que a interação endógena entre MKP-3 e FoxO1 é aumentada pela injeção de dexametasona (glicocorticóide sintético) e reduzida pela insulina (WU et al., 2010).

Já no hipotálamo a ativação da FoxO1 no núcleo arqueado aumenta a ingestão alimentar e diminui o dispêndio energético como previamente apresentado. Ao contrário, a inibição central da FoxO1 reduz a ingestão alimentar e a massa corporal. Notavelmente, os efeitos anorexigênicos da insulina e leptina foram significativamente diminuídos quando a FoxO1 hipotalâmica foi ativada. (DICKINSON et al., 2006; ROPELLE et al. 2009; LIU et al., 2011).

Entretanto, a proteína MKP-3 tendo a capacidade de desfosforilar a FoxO1 comprovadamente em tecido hepático talvez possa também agir em células hipotalâmicas, exercendo importante papel na regulação da atividade da FoxO1 no hipotálamo de animais obesos. Nesse sentido, o papel da MKP-3 pode ser amplo e

importante por atuar como um mecanismo de interrupção da fosforilação de outras proteínas. Já se sabe o papel da MKP-3 em desempenhar um papel importante na atenuação da sinalização MAPK. A ativação da via Ras / Raf / MEK / ERK pode atuar sobre importantes regulações fisiológicas envolvendo o metabolismo energético.

Outro dado interessante foi demonstrado por Ndong et al. (2014), onde foi demonstrado que a condição fisiológica pode regular a preferência de substratos da MKP-3. Ao administrar lipopolissacarídeos (LPS) em astrócitos com superexpressão de MKP-3 houve uma preferencial redução da pJNK em relação a pERK. Ademais, estudos em células de neurônios POMC, por exemplo, podem trazer grandes evidências se a MKP-3 pode modular, através da pFoxO1, a transcrição de neuropeptídeos relacionados com o controle da ingestão alimentar e com o gasto energético. Este entendimento é de extrema importância, visto que o hipotálamo é um órgão fundamental para manter a homeostase energética e a desregulação deste mecanismo ocorre em condições de síndrome metabólica, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2.

Ao contrário, intervenções capazes de regular proteínas de efeito negativo sobre a sinalização da insulina e leptina no hipotálamo se mostram promissoras na prevenção ou tratamento destas doenças. Dentre as ferramentas não farmacológicas o exercício tem se destacado com ações importantes a nível central e sobre o hipotálamo (FLORES et al., 2006; LUCIANO et al., 2008; ROPELLE et al., 2009; VAN DE SANDE-LEE et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015).

2.4. PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO E CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR

Estudos epidemiológicos têm demonstrado relação direta entre inatividade física e a presença de múltiplos fatores de risco à saúde como hiperglicemia, dislipidemias, hipertensão arterial, resistência à insulina, diabetes, e obesidade. Ao contrário, exercício físico se mostra como uma opção importante de tratamento destes fatores de risco, com melhoras que podem ocorrer independente da redução da massa corporal adiposa (CHIBALIN et al., 2000; HOUMARD et al., 1999; THIVEL et al., 2011).

Seu efeito não se restringe apenas ao seu gasto energético induzido, mas também evidências atuais mostram que o exercício físico interfere no controle da ingestão alimentar. Sugere-se que seja eficaz para gerar um déficit de energia de curto prazo e que os indivíduos tendem a não compensar a energia gasta durante o exercício nas horas

imediatas após o esforço, modulando o comportamento alimentar (MARTINS, MORGAN, TRUBY., 2008; MARTINS et al., 2008; THIVEL et al., 2012).

Em humanos já foi demonstrado que uma única sessão de exercício físico aumenta a captação de glicose mediada pela insulina em sujeitos normais, em obesos com resistência à insulina, e em diabéticos do tipo 2. (MARTINS, MORGAN, TRUBY., 2008). Além disso, há um grande número de estudos publicados nas últimas duas décadas que exploram a associação entre o exercício físico e a regulação da ingestão alimentar. Postula-se que a prática de exercício físico seja capaz de reduzir os níveis de marcadores inflamatórios em modelos experimentais e humanos e prevenir hiperfagia alterando hormônios reguladores do apetite, como a grelina, peptídeo YY (PYY), glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (MARTINS et al., 2007; MARTINS., 2008; UEDA., 2009; MARTINS., 2010; SCHUBERT., 2014), insulina e leptina (ROPELLE et al., 2010; PEDERSEN et al., 2004), assim como reverter quadros de inflamação causados pela dieta rica em gordura saturada através de estratégias anti-inflamatórias, geradas pelo exercício físico. (VAN DE SANDE-LEE et al., 2011).

A literatura propõe que as mudanças na regulação da ingestão alimentar podem resultar principalmente de alterações na sensibilidade aos hormônios insulina e leptina no sistema nervoso central, em resposta ao exercício físico (THIVEL et al., 2012; DA LUZ et al., 2011; PETERSEN et al., 2005). Estudos experimentais mostraram que o exercício físico está associado a um aumento da sensibilidade à insulina. Depois de uma sessão aguda de exercício físico a sensibilidade à insulina é aumentada em tecidos sensíveis à insulina, tais como, músculo esquelético, fígado, e hipotálamo (LUCIANO et al., 2008). O exercício é comprovadamente capaz de atenuar a atividade de proteínas inflamatórias com efeito negativo na via de sinalização da insulina (PAULI, et al., 2008; ROPELLE et al., 2006; DA SILVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011), sendo observado tanto em tecidos periféricos como também no SNC (LIU et al., 2011; DE SOUZA et al., 2005).

Em trabalho prévio BI (2005) e colaboradores verificaram que animais obesos submetidos a sessões de exercícios aeróbios tiveram redução significativa da adiposidade e a recuperação do peso foi retardada. Apesar de ter sido verificado concentrações plasmáticas reduzidas de leptina, não se observaram aumento da ingestão alimentar como forma compensatória para a perda de peso. Esse efeito foi secundário à ação direta do exercício nos núcleos dorso medial do hipotálamo, regulando a expressão dos neuropeptídeos CRF e NPY. Além disso, foi demonstrado que o exercício reduz a

expressão de NPY em hipotálamo de ratos diabéticos, sugerindo que o exercício seja capaz de modular a ingestão alimentar e o gasto energético através de circuitos neuronais (BI et al., 2005).

Na tentativa de elucidar o papel do exercício físico sobre o mecanismo molecular de modulação da fome, um grupo de pesquisadores avaliou a expressão e/ou atividade das proteínas envolvidas na transdução do sinal da insulina e leptina em hipotálamo após uma sessão aguda de exercício de natação. Foi demonstrado neste estudo que animais obesos exercitados previamente tratados com infusão intracerebroventricular de leptina e insulina reduziram de forma mais acentuada a ingestão alimentar se comparado a seus pares obesos não exercitados (ROPELLE et al., 2010).

Além disso, leptina e/ou insulina estimularam a fosforilação da proteínas IRS-1/2, assim como as associações destes substratos com a PI3q e ativação da Akt nos animais exercitados e o mesmo não aconteceu naqueles sedentários. Em adição, animais obesos submetidos ao exercício físico agudo apresentaram redução na expressão da proteína IKKalpha e fosforilação em serina 307 do IR no hipotálamo quando comparados a animais obesos não exercitados (ROPELLE et al., 2010). Como consequência desta redução da inflamação hipotalâmica os animais exercitados tiveram restaurados a fosforilação da Akt, promovendo um rebalço na ingestão alimentar modificado pela obesidade. Por fim, os animais obesos submetidos ao exercício físico apresentaram menor expressão de FoxO1 no núcleo celular quando comparado aos animais obesos sedentários.

Estes mecanismos, pelos quais essas modulações das vias ocorriam pelo exercício físico na condição de obesidade, foram esclarecidos após importantes estudos que demonstraram a importante ação anti-inflamatória do exercício mediada pela Interleucina-6 e Interleucina-10 em melhorar a sensibilidade à insulina e leptina hipotalâmica. Evidências em humanos e em modelos experimentais demonstraram que o exercício físico aumenta os níveis de IL-6 produzidas no músculo esqueléticos, assim como aumento de IL-10, a qual é classicamente considerada como anti-inflamatória.

Outros dados corroboram que uma única sessão de exercício físico foi suficiente para melhorar a sensibilidade a leptina e insulina através da IL-6. O tratamento intracerebroventricular de IL-6 recombinante em ratos foi suficiente para aumentar o gasto energético e reduzir a ingestão alimentar, por outro lado o tratamento intraperitoneal não obteve o mesmo efeito sugerindo que os efeitos anti-obesidade

através da IL-6 é advindo pela sua ação no sistema nervoso central. (ROPELLE et al., 2010; WALLENIUS et al., 2002; FRANCKHAUSER et al., 2008; PEDERSEN et al., 2004).

Exercício físico agudo de natação e/ou de esteira rolante de baixa a moderada intensidade reduz a hiperfagia em animais obesos através do efeito inibitório sobre as proteínas IKK/NF- κ B e de estresse de retículo no hipotálamo através das atividades anti-inflamatórias desempenhadas por IL-6 e IL-10 (ROPELLE et al., 2010). Estes efeitos anti-inflamatórios evidenciados pela IL-6 e IL-10 foram observados tanto em roedores quanto em humanos (ZEMBRON-LACNY., 2013; REIS GONCALVES., 2012). Esta redução da inflamação proporciona melhora da sensibilidade à insulina e à leptina no hipotálamo, contribuindo para a redução da ingestão alimentar.

Além disso, o exercício físico agudo de natação de alto volume e baixa intensidade, aumenta as vias anorexígenas e atenua os sinais orexígenos, promovendo sinais de saciedade, através da redução de NPY e aumento de POMC predominantemente no núcleo arqueado de animais obesos. De forma interessante o exercício agudo pode induzir uma resposta anorexígena no hipotálamo, independente da mudança da massa corporal (CHIARREOTTO-ROPELLE et al., 2013).

À luz desses achados, fica evidente que a relação entre a via de sinalização da insulina e o controle da ingestão alimentar tem seu elo nas proteínas PI3q/Akt e no fator de transcrição FoxO1. Como apresentado em tecidos periféricos, a proteína MKP-3 pode interferir negativamente ao sinal da insulina prejudicando a função intracelular da FoxO1. Por outro lado, é possível que o exercício físico tenha papel relevante sobre a expressão da proteína MKP-3, marcadamente aumentada na condição de inflamação induzida por dieta rica em gordura, com possível repercussão no controle da homeostase energética. (OLIVEIRA et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do exercício físico sobre o conteúdo proteico de MKP-3 e sinalização da insulina em hipotálamo de camundongos com indução de obesidade através de dieta rica em gordura saturada.

3.2. Objetivos Específicos

Para este estudo foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar o modelo de obesidade induzido através da oferta da dieta rica em gordura nos camundongos;
- Investigar a expressão da proteína MKP-3 no hipotálamo de camundongos controle, obesos e obesos exercitados agudamente;
- Analisar a ingestão alimentar dos camundongos após a injeção i.c.v. de insulina;
- Verificar os níveis proteicos e de fosforilação da Akt e Foxo1 no hipotálamo dos animais estimulados com insulina;
- Avaliar o efeito do exercício físico no modelo de obesidade induzido por dieta rica em gordura sobre alguns parâmetros da composição corporal e fisiológicos dos camundongos;
- Analisar o efeito do exercício físico sobre o conteúdo proteico de MKP-3 e de fosforilação da Akt e Foxo1 hipotalâmica dos camundongos obesos;
- Avaliar em células HEK293 os efeitos da superexpressão da MKP-3 sobre a fosforilação da proteína FoxO1;
- Investigar os efeitos da injeção i.c.v. de adenovírus para superexpressão de MKP-3 no hipotálamo e o conteúdo proteico e fosforilação de Akt e FoxO1 hipotalâmica;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais.

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), com quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram previamente pesados, alocados em gaiolas individuais com livre acesso a água e ração comercial padrão (Presence®). Foram utilizados de 5-6 animais por grupo experimental, todos acondicionados em ambiente com temperatura ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro) controlados. Durante todo o período experimental, foi controlada a ingestão alimentar e a evolução ponderal, uma vez por semana. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (Processo n°4064-1).

Preparo do Modelo Experimental:

Um grupo de animais foi submetido à dieta hiperlipídica para o desenvolvimento de obesidade. A dieta que propicia o desenvolvimento de obesidade foi estruturada a partir de uma dieta normal para roedores, proposta por Reeves et. al., em 1993, e adotada pelo American Institute of Nutrition (AIN) como padrão. Esse modelo originalmente proposto possui 4% lipídios em sua formulação, oriundos exclusivamente do óleo de soja. Animais que consumiram esta dieta fizeram parte do grupo controle (C). Os animais se tornam obesos e resistentes à insulina a partir do consumo de uma dieta semelhante à AIN, contudo, modificada em seu conteúdo de lipídios. Esta dieta possuiu 3% de lipídios, sendo oriundos do óleo de soja e os outros 31% de gordura suína (banha) (FAN et.al., 1997).

| Ingredientes | Dieta Controle** | Dieta DIO*** |
|------------------------------------|------------------|--------------|
| | (1000 g) | (1000 g) |
| Amido (Q.S.P.)* | 427,5 | 115,5 |
| Caseína | 200 | 200 |
| Amido de Milho Dextrinizado | 132 | 132 |
| Sacarose | 100 | 100 |
| Óleo de Soja | 40 | 40 |
| Banha | 0 | 312 |
| Celulose microfina (Fibra) | 50 | 50 |
| Mix Minerais | 35 | 35 |
| Mix Vitaminas | 10 | 10 |
| L-Cistina | 3 | 3 |
| Bitartarato de colina | 2,5 | 2,5 |
| TOTAL | 1000 | 1000 |

Tabela 1. Dietas Experimentais. *Q.S.P. – Amido adicionado em Quantidade Suficiente Para – completar 1000 g de dieta. **AIN – American Institute of Nutrition, segundo Reeves, 1993. ***Dieta modificada para 35% de lipídios (312 g de banha + 40 g de óleo de soja). DIO – Dieta indutora de obesidade. Dieta Controle com 3,47Kcal/g e DIO com 5,43Kcal/g.

Os animais que consumiram a dieta da AIN – American Institute of Nutrition, fizeram parte do grupo chamado Controle. Os animais que consumiram a dieta DIO – Dieta indutora de obesidade fizeram parte do grupo chamado Obesos. A oferta da dieta hiperlipídica aos grupos Obesos aconteceu no período de oito semanas. Para o Índice de Lee os resultados foram obtidos, através do comprimento naso-anal e o peso corpóreo, utilizando o cálculo $(\text{peso corpóreo (g)} / 3) / \text{comprimento naso-anal ((cm) \times 1000)}$ (NOVELLI et al., 2007). Os resultados de gorduras foram feitos após a eutanásia, as quais foram retiradas, lavadas em solução salina (0,9%) e pesadas. Os pesos das gorduras foram expressos em relação ao peso corpóreo.

Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT) e Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Os testes foram realizados ao final do período de oito semanas. Os alimentos para os grupos foram retirados oito horas antes do teste. Durante o teste ITT a primeira coleta de sangue equivale ao tempo 0 do teste e antecede a injeção de insulina. Após a primeira coleta foi feita a injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly (Indianápolis, IN, USA) na concentração de (2 U/Kg de peso corpóreo) via intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sanguínea

utilizando um glicosímetro portátil (Aparelho de Glicemia Accu-Chek Active). A velocidade constante do decremento da glicose (Kitt) foi calculada (Microsoft Excel 2013®) usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$ e pelo método trapezoidal conforme previamente descrito (BOTEZELLI et al., 2016). Para o GTT, após a coleta de sangue para determinação da glicemia inicial, foi aplicada dose de 2g/Kg de glicose (via intraperitoneal) e novas amostras foram coletadas da cauda do animal após 30, 60 e 120 minutos. A área sob a curva (AUC) foi calculada pela média dos valores de glicose pelo método trapezoidal (Microsoft Excel 2013®) (BOTEZELLI et al., 2016). Ademais, os valores de glicemia de jejum foram obtidos através do primeiro ponto de coleta do ITT.

Para o resultado de insulinemia as dosagens foram feitas através de teste Elisa. A leitura das amostras foi realizada por um equipamento (BioTek®) leitor de Elisa que envia a leitura para um software chamado Gen5, os dados obtidos foram calculados posteriormente para se obter o valor final em ng/mL. As dosagens de insulina foram feitas com o teste Ultra Sensitive Mouse Insulin Elisa Kit, respeitando-se as orientações do fabricante na elaboração dos testes.

Preparo do modelo experimental para protocolo de exercício físico agudo

O mesmo procedimento do preparo do modelo experimental descrito acima foi adotado. Os animais que consumiram dieta hiperlipídica foram distribuídos em dois grupos, um grupo chamado obesos, sendo os animais obesos não exercitados considerados como grupo sedentário (Obeso) e o grupo submetido ao protocolo de exercício agudo considerado obeso exercitado agudamente (Obeso Exe). A oferta da dieta hiperlipídica aos grupos obeso que não se exercitaram e Obeso Exe aconteceu no período de oito semanas. Em seguida o grupo Obeso Exe foi submetido ao protocolo de exercício físico agudo.

Preparação para o exercício físico agudo

Todos os animais exercitados foram adaptados ao meio aquático (conforme descrição no item Exercício físico agudo abaixo). E todos os grupos (incluindo animais controles e obesos sedentários) foram inseridos ao meio líquido com água na profundidade do tórax (ao mesmo tempo e condições dos animais exercitados). Esse procedimento visou simular o estresse recebido pelos grupos de animais exercitados.

Protocolo de exercício físico agudo (sessão única de esforço)

A sessão de exercício físico agudo foi realizado em tanques de vidro durante o ciclo claro dos animais. Inicialmente os ratos foram aclimatizados ao meio líquido por três dias (10 min por dia), sendo a água colocada na profundidade do tórax. Em seguida, submetidos a exercício de natação por 5, 10 e 15 minutos durante três dias consecutivos, respectivamente, com água na profundidade descrita a seguir (Figura 2).

Após esta adaptação e em um único dia de experimento, os animais nadaram individualmente nos tanques com aproximadamente 25 cm de comprimento e largura e 70 cm de profundidade. A temperatura da água foi mantida em 31-32°C. Os animais realizaram o exercício de natação em duas sessões de 3 horas, separadas por 45 minutos de repouso. Este protocolo tem sido previamente utilizado em nosso laboratório (PAULI et al., 2008; ROPELLE et al., 2006). Imediatamente ao término da última sessão de exercício físico, os animais previamente canulados, receberam os tratamentos específicos (salina ou insulina) i.c.v para extração do hipotálamo e análise da proteína de interesse. Para todas as análises foram utilizados animais do grupo controle e obeso não exercitado para devidas comparações.

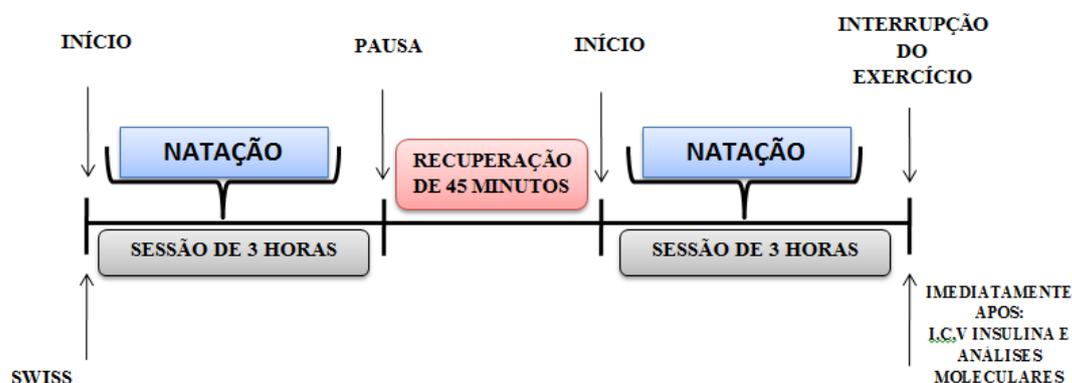


Figura 2. Esquema ilustrativo do protocolo de Exercício Físico agudo de Natação. Camundongos Swiss controles e obesos foram utilizados durante o protocolo.

Implante das Cânulas:

Os animais foram submetidos à anestesia com ketamina na dose de 200ul/Kg, xilazina na dose de 400ul/kg, diazepam na dose de 200ul/Kg misturados com 200ul de salina, os quais ao término do procedimento cirúrgico, receberam paracetamol na dose de 200mg/kg de peso, diluído em água. O procedimento foi iniciado quando os reflexos corneanos e de retirada da pata ao estímulo da dor foram perdidos. Os camundongos

foram adequadamente posicionados no aparelho para realização de cirurgia estereotáxica e, após tricotomia e anti-sepsia da região craniana, realizamos incisão inter-parietal de aproximadamente 1 cm de extensão. A seguir, o periósteo foi divulsionado e com a calota craniana exposta, foi possível visualizar o Bregma (Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates). A implantação das cânulas obedeceu às coordenadas estereotáxicas para alcance do terceiro ventrículo hipotalâmico (antero posterior -1.8 e profundidade -5.0) previamente estabelecidas pelo atlas estereotáxico.

Depois de implantada, a cânula foi fixada ao crânio do animal com acrílico polimerizante (Imagem 3). Após sete dias 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 µl de solução 10^{-6} M) para avaliação da adequação da posição da cânula. Animais com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados. Os procedimentos foram realizados de acordo com estudos prévios (CHIARREOTTO-ROPELLE et.al., 2013; FLORES et.al., 2006; ROPELLE et.al., 2010).

A seguir segue uma imagem do procedimento realizado para o implante das cânulas nos camundongos.

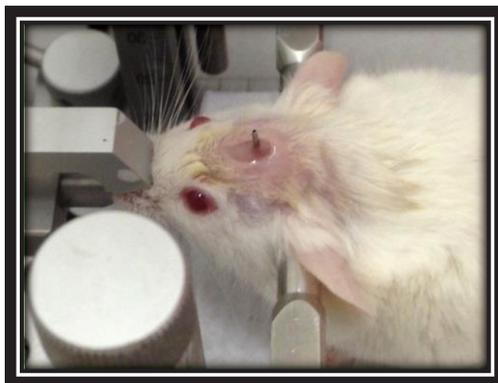


Figura 3: Cirurgia Esteriotáxica de Camundongos Swiss Obesos.

Os animais que foram submetidos ao protocolo de exercício físico agudo de natação realizaram a cirurgia estereotáxica para implante de cânulas, foram eles, animais obesos sedentários e obesos exercitados agudamente. O grupo de animais que não se exercitaram foi privado de alimento por 8 horas sem restrição de acesso a água. O grupo de animais que realizou o protocolo de exercício agudo, recebeu logo após o término do exercício, a injeção de salina (para simular o estresse passado pela cirurgia) ou insulina (200mU) através da cânula implantada no crânio dos animais. Assim, após

10 minutos dos respectivos tratamentos, os animais foram eutanasiados e o hipotálamo retirado para análise das proteínas de interesse por *Western Blot*.

Cirurgia Estereotáxica e Tratamento Intracerebroventricular

O procedimento de cirurgia estereotáxica foi realizado após os animais perderem seus reflexos pela administração i.p de ketamina (200ul/Kg), xilazina (400ul/Kg) e diazepam (200ul/Kg). Os camundongos foram adequadamente posicionados no aparelho para realização de cirurgia estereotáxica e, após tricotomia e anti-sepsia da região craniana, realizamos incisão interparietal de aproximadamente 1 cm de extensão. A injeção do veículo (Adenovírus MKP-3 e EGFP; ou insulina) feita por cateter e pela seringa Hamilton, obedeceu às coordenadas estereotáxicas para alcance do terceiro ventrículo hipotalâmico (antero posterior -1.8 e profundidade -5.0) previamente estabelecidas pelo atlas estereotáxico (DE SOUZA., 2010). Depois de injetado o adenovírus MKP-3 ou EGFP (1,0 µl), a calota craniana foi fixada com acrílico polimerizante. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam paracetamol diluído em água (200mg/kg). Após cinco dias de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos à nova cirurgia estereotáxica para o tratamento i.c.v. de insulina (2,0 µl) seguindo as mesmas coordenadas descritas anteriormente. Após 5 minutos da injeção de insulina, os animais foram eutanasiados para o início das análises moleculares.

Extração dos Tecidos e Análise de *Western Blot*

Após a perda dos reflexos corneanos e 5 minutos após a administração de insulina via i.c.v., foi feita a eutanásia dos animais por decapitação para extração do hipotálamo. O tecido foi homogeneizado em tampão de extração (1% Triton-X 100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 0.1 mg of aprotinin/ml) na temperatura de 4 °C no homogeneizador de tecidos Bead Ruptor 12 (OMNI®) processado na velocidade baixa durante 20 segundos. O lisado resultante foi centrifugado a 12000 rpm a 4 °C durante 15 minutos (Eppendorf® 5804R) e o conteúdo proteico foi determinado pelo método fotolorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976). Foi utilizado 80µg da proteína para leitura e preparação das amostras. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após a etapa de transferência para a

membrana de nitrocelulose, essas foram incubadas durante 1 minuto com corante Ponceau-S 1%, para garantia do controle de conteúdo proteico equalizado entre as amostras (GILDA; GOMES, 2013).

Posteriormente estas membranas foram incubadas em temperatura ambiente durante 1 hora com leite 5% e por fim incubadas com anticorpos específicos. As bandas específicas foram detectadas através de reagente quimiofluorescente e consequente exposição em filmes RX (Kodak®) e quantificadas por densitometria (software UN-SCAN-IT gel 6.1).

Ensaio de Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg.kg⁻¹) e perfundidos com PBS (PBS 0,1 M; pH 7,4; 0,9% salina), seguido de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4. O cérebro foi extraído e colocado em solução contendo 20% de sacarose em paraformaldeído 4% à 4°C por duas horas e, em seguida, transferida para soluções contendo 20%, 30% e 40% de sacarose em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. O cérebro foi embebido em composto Tissue-Tek OCT (SakuraFinetek, Torance, CA), seccionado em criostato produzindo cortes de 30 µm e colocado em solução crioprotetora (PBS [PBS 0,1 M; pH 7,4; 0,9% salina]; etilenoglicol; glicerol). Os cortes foram incubados com anticorpos primários específicos, a seguir com secundários marcados com fluoróforos e colocados em lâminas tratadas previamente com poli-L-lisina para aderência do tecido. A seguir foram cobertos com lamínula e visualizados em microscópio de imunofluorescência Leica DMI 4000 B usando um sistema de captura de imagens.

Anticorpos

Os anticorpos utilizados para o *Western Blot* a princípio foi anti-Akt (sc-8312, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-Akt (Ser473) (sc-101629, Santa Cruz Biotechnology), anti-FoxO1 (9454s, Cell Signaling Technology, MA), anti-phospho-FoxO1 (Ser256) (9461s, Cell Signaling Technology, MA), anti-phospho-Erk1/Erk2 (AF1018, R&D Systems), anti-Erk1/2 (AF1576, R&D Systems), anti- α -tubulin (NB100-690, Novus Biologicals), e anti-MKP-3 (bs, 11546R, Bioss).

Análises realizadas In Vitro

Foram realizados experimentos em células HEK (Human Embryonic Kidney 293 cells), para produção do vetor adenoviral da proteína MKP-3, no qual foi realizado os seguintes procedimentos.

Cultura de células

Células HEK (Human Embryonic Kidney 293 cells), originalmente composta de células de um rim pertencente a um embrião humano crescida em cultura de tecidos. Foram usadas para a produção dos vetores adenovirais e ensaios para teste de expressão das proteínas de interesse. As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,1 U/mL de penicilina e 0,1 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂.

Vetores virais

Os vetores virais utilizados foram adenovírus do tipo 5 deficientes em replicação e foram obtidos e produzidos em colaboração com o Dr. Márcio Chaim Bajgelman, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas. Os vírus foram manipulados sob condições de segurança nível 2 (NB-2) no LNBio, segundo certificação CIBio.

Inicialmente, os genes da MKP-3 foram clonados entre os sítios *NheI* e *BamHI* no vetor pShires (Figura 4; cedido pelo Prof. Dr. Armando Morais Ventura), que permite a clonagem posterior em vetor adenoviral pAdeno-X (usando os sítios *I-CeuI* e *PI-SceI*) e garante, além da superexpressão da proteína de interesse, a co-expressão do gene repórter EGFP, permitindo facilmente a identificação das células transfectadas ou transduzidas.

Posteriormente, os vetores adenovirais foram construídos utilizando-se o kit *Adeno-X™ Expression System 1* (Clontech; Figura 5), e foram usados tanto em cultura de células quanto em animais para induzir a superexpressão da MKP-3 em hipotálamo de camundongos Swiss.

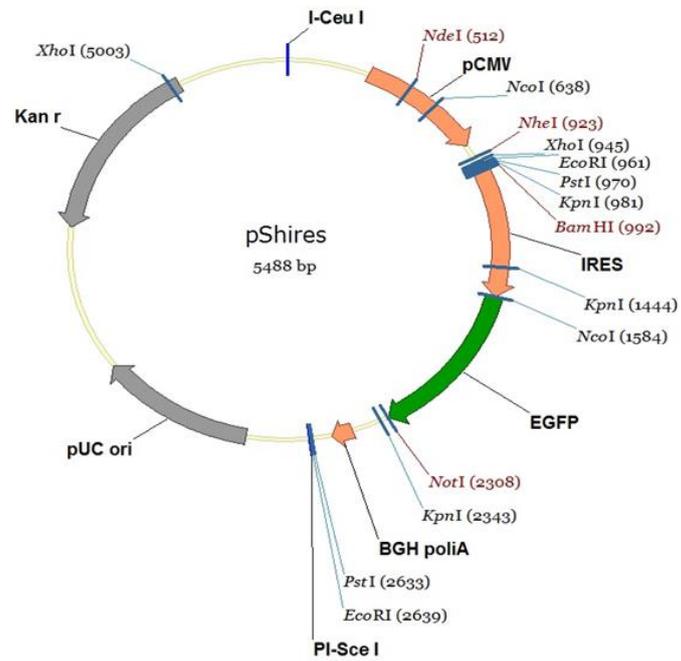


Figura 4. Esquema do vetor pShires (cedido pelo Prof. Dr. Armando Morais Ventura), que foi usado para a clonagem dos genes da MKP-3 e posterior subclonagem em vetor adenoviral. Os sítios *NheI* e *BamHI* foram usados para a clonagem dos genes de MKP-3.

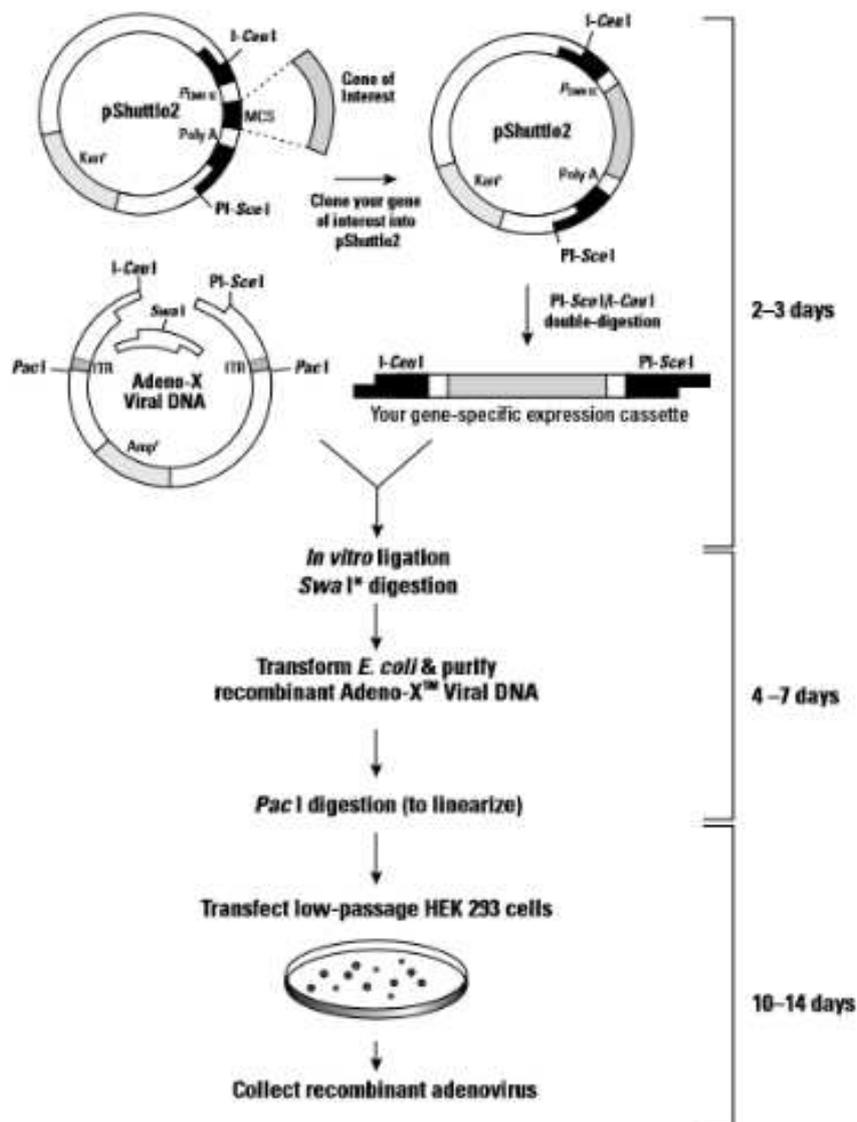


Figura 5. Esquema de obtenção dos adenovírus recombinantes deficientes em replicação. (Adeno-X™ Expression System 1; Clontech).

Quantificação do título viral por *End Point*

Para determinação do número de partículas virais por *End Point*, foram usadas células HEK293, semeadas em placas de 96 poços. Os vírus purificados foram diluídos em meio de cultura e aplicados nos primeiros poços das placas, na proporção 1:100. Em seguida foram realizadas diluições seriadas na proporção 1:10 até 10^{-14} , e para cada adenovírus expressando as isoformas de MKP-3 foram feitas oito réplicas. Em seguida, o título foi calculado, utilizando a fórmula: $T = 10^{[1 + (S - 0,5)]}$; onde S = somatória das proporções de morte celular para cada diluição. O protocolo foi adaptado seguindo orientações do manual do Adeno-X™ Expression System 1 (Clontech).

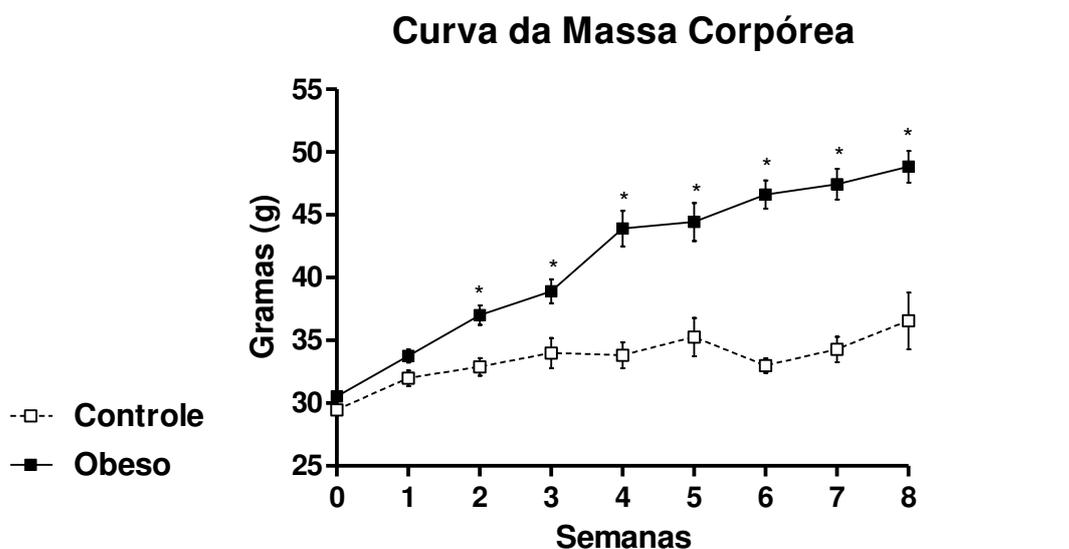
Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média (SEM), onde foi realizado o teste de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk W-test para checagem da distribuição dos dados. Quando os dados apresentaram normalidade, foi realizado test-t de Student, e para dados não normais, foi utilizado o teste de Mann-whitney. Em relação aos gráficos de linha, foi realizado o teste two-way anova com medidas repetidas para avaliação dos pontos separadamente. Foi adotado o nível de significância $p \leq 0.05$. O programa GraphPad Prism 5.00.288 foi empregado para efetuar as análises.

5. RESULTADOS

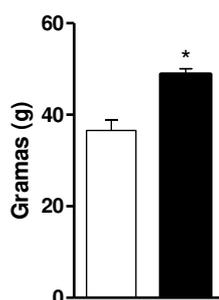
Os primeiros ensaios envolveram o grupo controle (magro) e o grupo obeso. Na figura 6, o gráfico de linhas representa a evolução da massa corpórea dos animais do grupo controle e obeso durante oito semanas de experimento. Observa-se que na segunda semana os animais obesos apresentaram maior massa corpórea que os animais controles (alimentados com a dieta padrão para roedores), e este comportamento seguiu até a oitava semana.

A



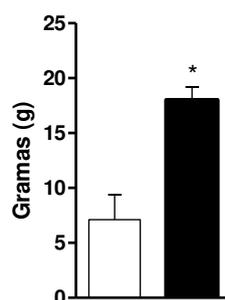
B

Massa Corpórea Final



C

Δ Massa Corpórea



D

AUC Massa Corpórea

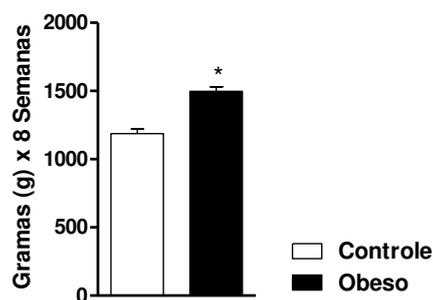


Figura 6. Dados morfológicos dos animais controles e obesos. (A) Curva da massa corpórea durante 8 semanas. (B) Massa corpórea ao final do experimento. (C) Δ Massa corpórea entre a primeira e a oitava semana de tratamento. (D) Área sob a curva da massa corporal durante as oito semanas. As barras e linhas presentes nos gráficos representam à média e o erro padrão da média (SEM) (n=5). *p<0.05 versus grupo controle.

Ademais, o grupo obeso teve maior conteúdo total de gordura epididimal, mesentérica e retroperitoneal quando comparados ao grupo controle (Figura 7A). Isto mostra que a dieta hiperlipídica utilizada foi eficiente em induzir obesidade nos animais. Na figura 7B-C estão dispostos também os resultados referentes ao tecido adiposo intraperitoneal total, a qual se refere à soma o tecido adiposo mesentérico, epididimal e retroperitoneal dos animais, assim como o índice de Lee.

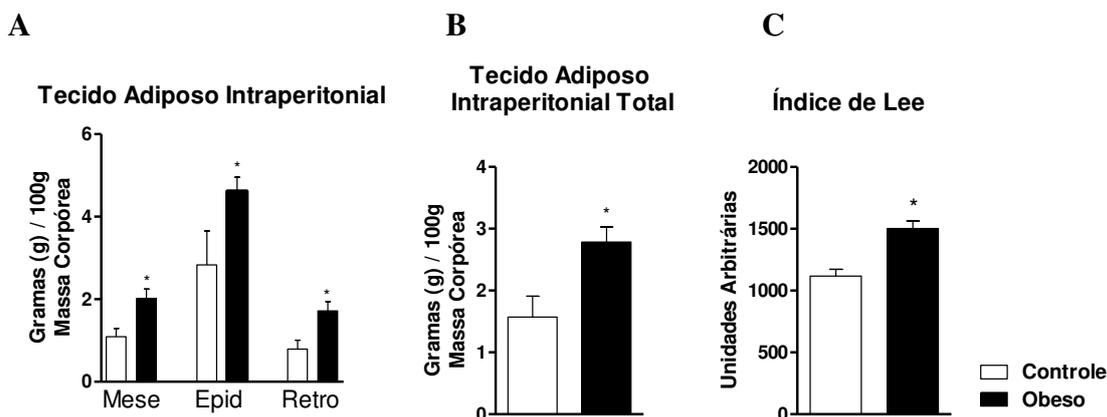


Figura 7. Dados fisiológicos dos animais controles e obesos. (A) peso de gordura, mesentérica (Mese), epididimal (Epid) e retroperitoneal (Retro). (B) Peso da somatória de todos tecidos. (C) Índice de Lee. As barras e linhas presentes nos gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) (n=10). *p<0.05 versus grupo controle.

Essas alterações morfológicas resultaram no agravamento da hiperglicemia e hiperinsulinemia de jejum. Na Figura 8, a glicemia e a insulinemia foram maiores nos grupos de animais obesos em relação aos animais controles.

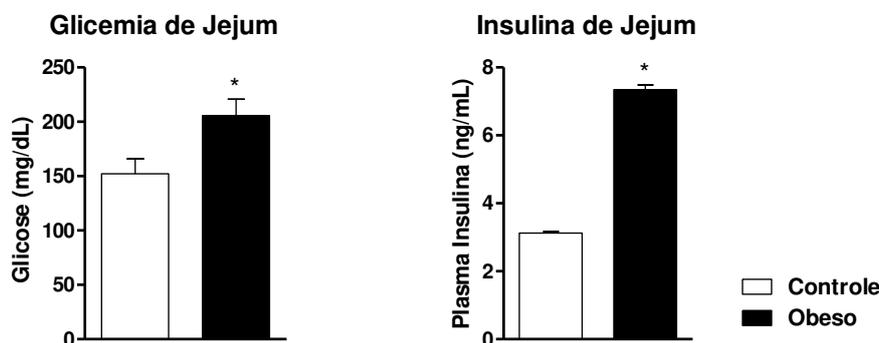


Figura 8. Valores referentes à glicemia (3A) e insulinemia (3B) de jejum dos animais dos grupos controle (magro) e exercitado (n=5 controle) (n=5 obesos). As barras e linhas presentes nos gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) (n=5). *p<0.05 versus grupo controle.

Corroborando com estes resultados, verifica-se que a taxa de decaimento da glicose foi menor nos animais obesos quando comparados aos animais controles (Figura 9A). Ademais, acompanhando este distúrbio metabólico, nota-se que a área sob a curva do teste de tolerância à insulina (AUC-ITT) e do teste de tolerância à glicose (AUC-GTT) foi maior nos animais obesos em relação aos controles (Figura 9C-E), assim como a taxa de remoção da glicose dos animais obesos foi significativamente menor quando comparados ao grupo controle (Figura 9D).

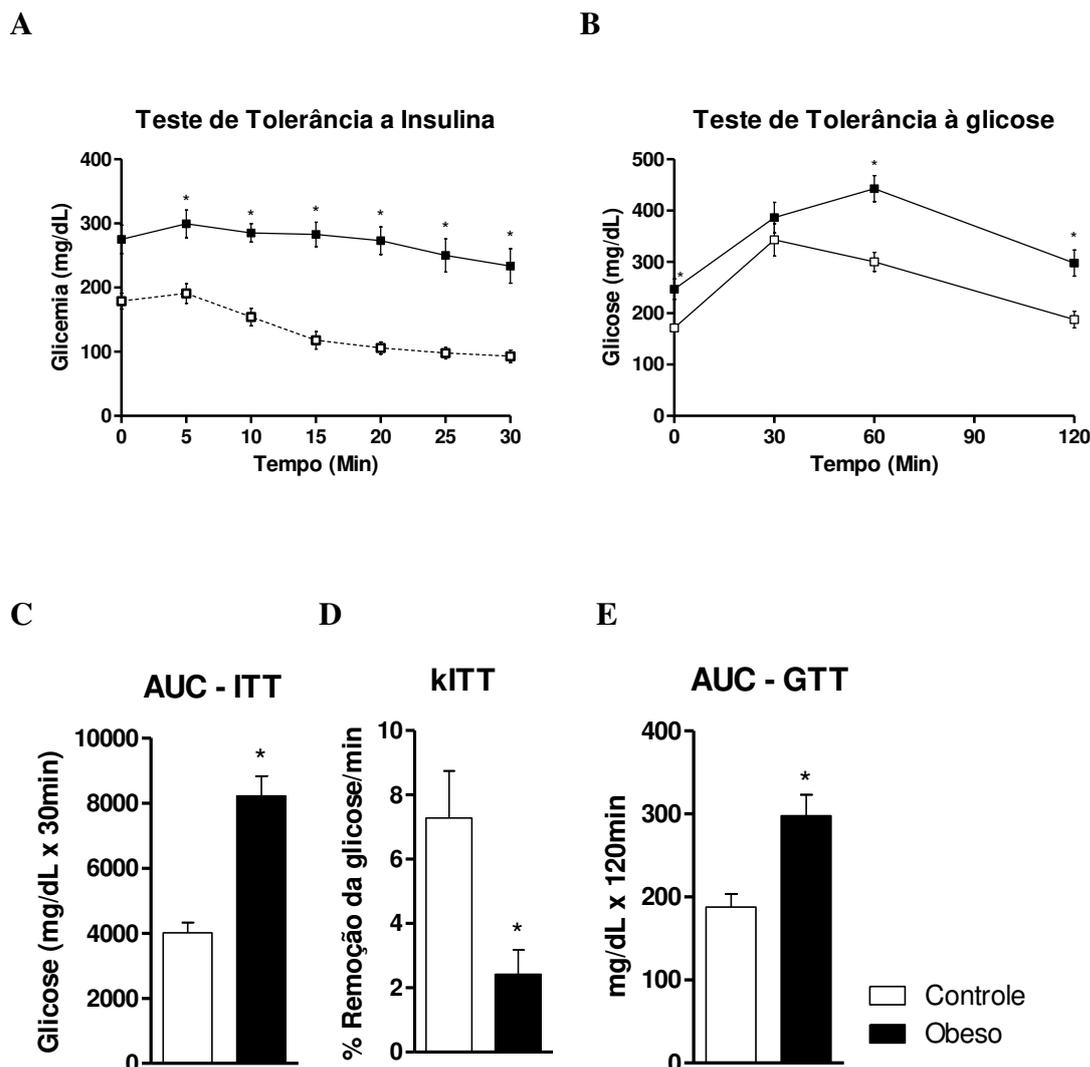


Figura 9. Valores de glicose em cada estágio do teste de tolerância à insulina nos animais controles e obesos (A). Valores de glicose em cada estágio do teste de tolerância à glicose nos animais controles e obesos (B). Dados de área sob a curva do ITT (C). Porcentagem do consumo de glicose por minuto de ambos os grupos controles e obesos (D). Dados de área sob a curva do GTT (E). (n=5 controle) (n=5 obesos). As barras e linhas presentes nos gráficos representam à média e o erro padrão da média (SEM) (n=5-10). *p<0.05 versus grupo controle.

Após os resultados fisiológicos que demonstraram que a dieta rica em gordura foi capaz de induzir obesidade e causar redução na sensibilidade à insulina, foi realizada a injeção de insulina para análise de ingestão alimentar de 12 horas (Figura 10).

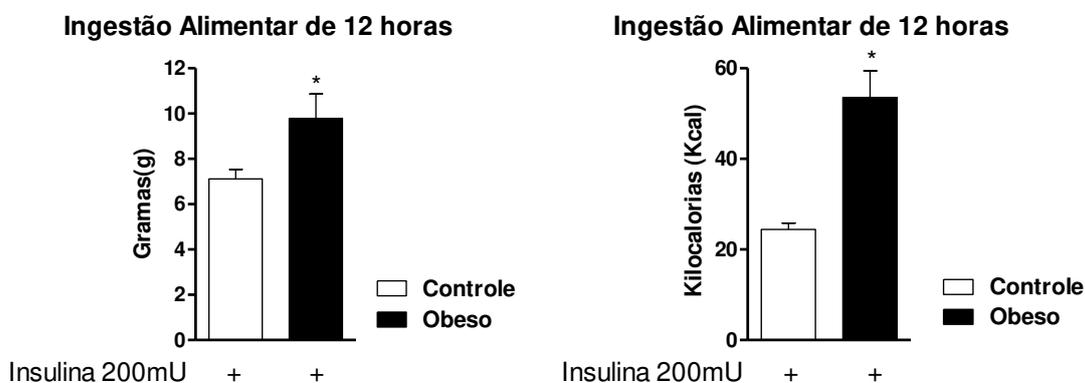


Figura 10. Valores referentes à ingestão alimentar de doze horas após estímulo i.c.v. com insulina dos animais dos grupos controle (controle n=5), e obeso (n=5). Dados referentes às médias e o erro padrão (SEM) da média de cada grupo experimental. *p<0.05 versus grupo controle.

Os dados obtidos permitem sugerir que a dieta hiperlipídica leva à diminuição da sensibilidade à insulina e aumento do balanço energético positivo pelo aumento na ingestão alimentar.

Sabendo a importância da atividade fosfatase da MKP-3 sobre a FoxO1 e a Erk1/2, nós avaliamos a fosforilação destas proteínas na situação de obesidade. Sendo assim, observamos que na condição de obesidade, os animais apresentaram aumento no conteúdo de MKP-3 e os valores de beta-actina não diferiram entre os grupos (Figura 11).

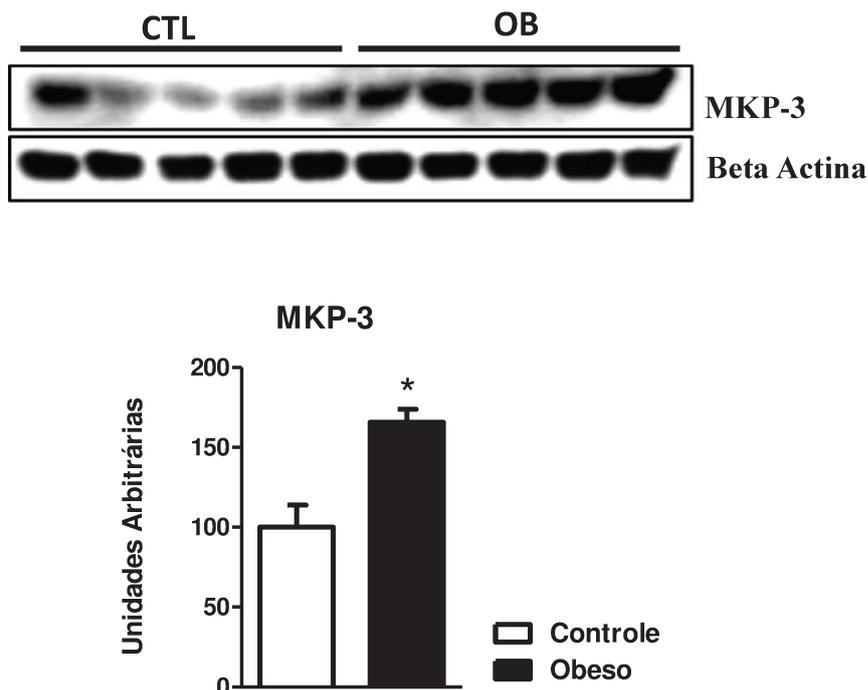


Figura 11. Aumento da MKP-3 hipotalâmica em camundongos obesos. Conteúdo proteico de MKP-3 no hipotálamo de camundongos controles e obesos normalizada pelo controle Beta-actina. As barras presentes nos gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) (n=5). * $p < 0.05$ versus grupo controle.

O aumento do conteúdo de MKP-3 no tecido hipotalâmico está associado à diminuição da fosforilação de duas proteínas importantes para o controle energético (pFoxO1 e pErk1/2), provavelmente pela sua atividade fosfatase. (Figura 12A e B). Em relação à fosforilação da proteína Akt, o grupo obeso apresentou uma diminuição de $p=0,0584$ da fosforilação da Akt em relação ao grupo controle, demonstrando os prejuízos na via de sinalização da insulina em resposta à dieta rica em gordura saturada (Figura 12C). Ademais, nossos resultados sobre o conteúdo proteico das proteínas totais (Foxo1 e erk1/2) não apresentaram diferença entre os grupos.

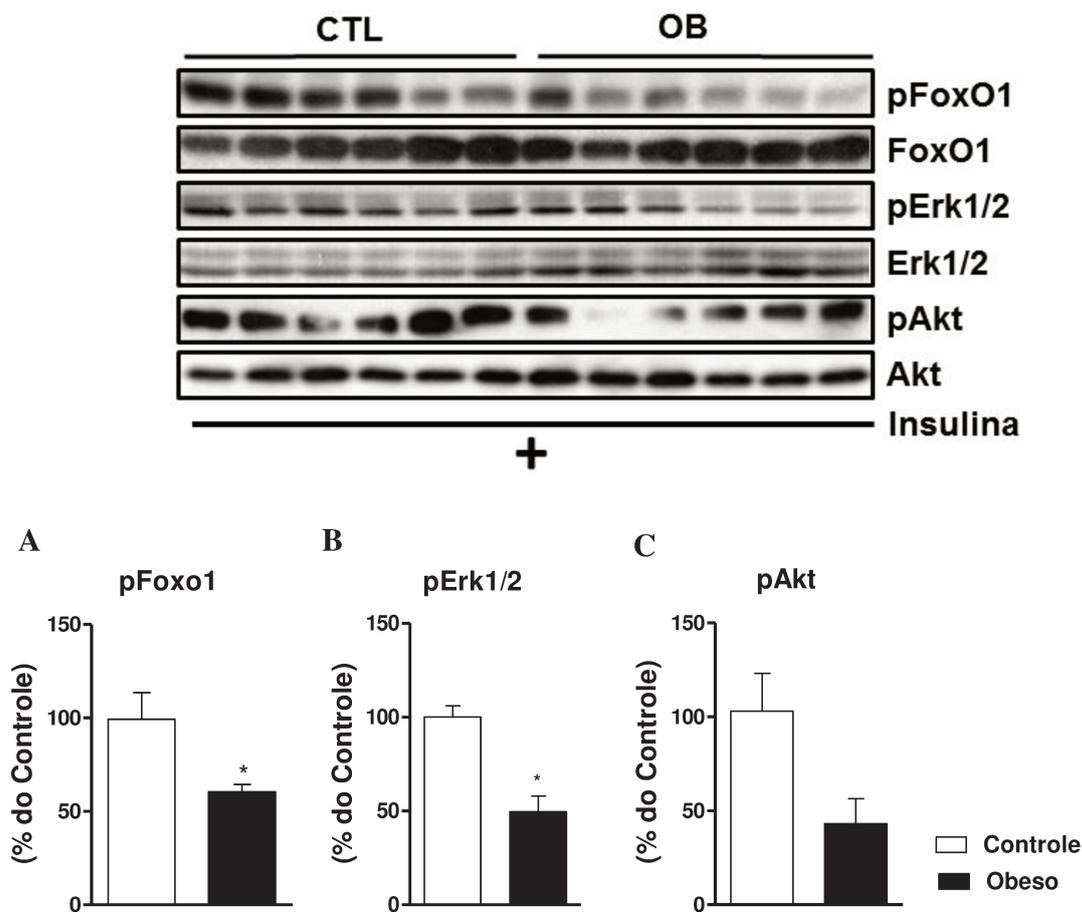


Figura 12: Fosforilação das proteínas envolvidas com a atividade fosfatase da MKP-3 (pFoxO1 e pErk1/2) (A). Fosforilação da FoxO1 (S256) normalizada pelo seu conteúdo total (B). Fosforilação da Erk1/2 (T202/Y204/T185/Y187) normalizada pelo seu conteúdo total (C). Fosforilação da Akt (S473) normalizada pelo conteúdo total de Akt. As barras presentes nos gráficos representam à média e o erro padrão da média (SEM) (n=6). *p<0.05 versus grupo controle.

Os dados obtidos permitem considerar que a dieta hiperlipídica aumenta a expressão da proteína MKP-3, e esta contribui de maneira significativa para o estabelecimento da obesidade. Além disso, observa-se que o aumento dos níveis de MKP-3 está associado com uma redução na fosforilação da FoxO1 e da pERK. Estes resultados foram acompanhados por aumento na ingestão alimentar e da massa corporal total e adiposa dos camundongos.

Visando avaliar a ação fosfatase da proteína MKP-3, este estudo avaliou os efeitos da superexpressão da proteína MKP-3 em células HEK293. A seguir (Figura 13) é apresentada uma análise desta clonagem por enzima de restrição, indicando a liberação de insertos no tamanho esperado (1147 pb) no vetor pShires.

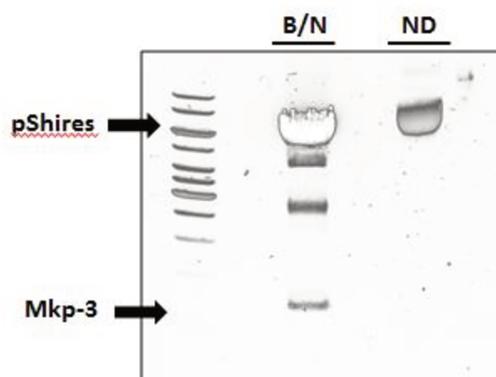


Figura 13. Análise por enzima de restrição em gel de agarose 0,8% realizado com as amostras: pShires MKP-3 digerida com enzimas *Bam*HI e *Nhe*I (B/N); e com a mesma amostra não digeridas (ND).

Em seguida, a expressão deste clone foi testada transfectando-o em células HEK293 e realizando-se os ensaios de *Western Blot* com as proteínas de interesse, conforme apresentado na figura 14. A seta em preto indica a superexpressão da proteína recombinante MKP-3 em comparação com as proteínas endógenas, presentes também no controle (pShires). Observamos que os valores de alpha-tubulina não diferiram entre os grupos.

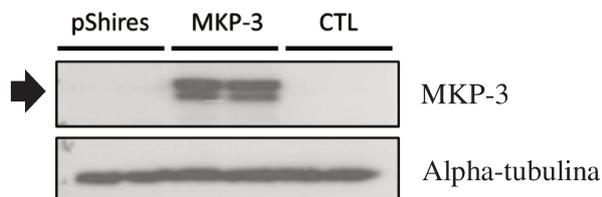


Figura 14. Teste de expressão por *Western Blot* anti-MKP-3 de células HEK293 transfectadas com pShires e pShires-MKP3. A seta preta indica a superexpressão da proteína MKP-3.

As células transfectadas com os plasmídeos pShires, pShires-MKP-3, foram observadas em microscópio de fluorescência, indicando a co-expressão do gene repórter EGFP em todas as amostras (Figura 15).

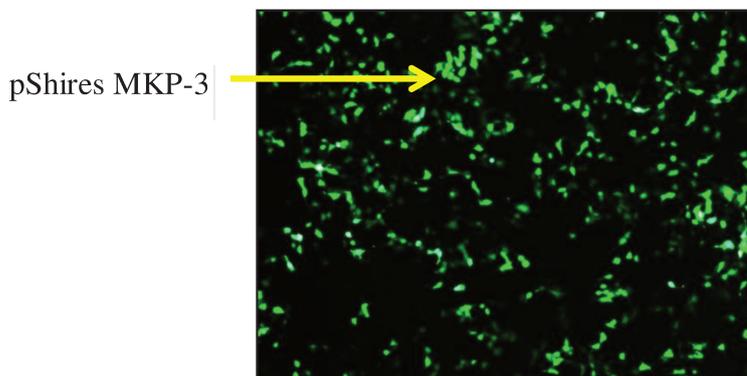


Figura 15. Células HEK293 transfectadas com pShires e observadas em microscopia de fluorescência.

Após a subclonagem no vetor adenoviral, iniciou-se a obtenção dos adenovírus expressando o gene MKP-3 em células HEK293. A Figura 16 confirma que os plasmídeos adenovirais estavam subclonados com o gene da MKP-3 e os valores de alpha-tubulina não diferiram entre os grupos.

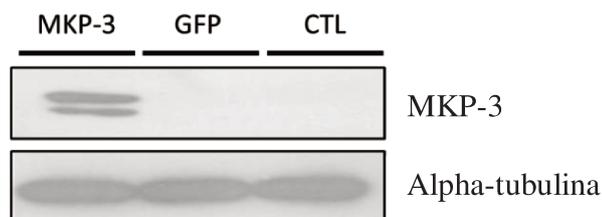
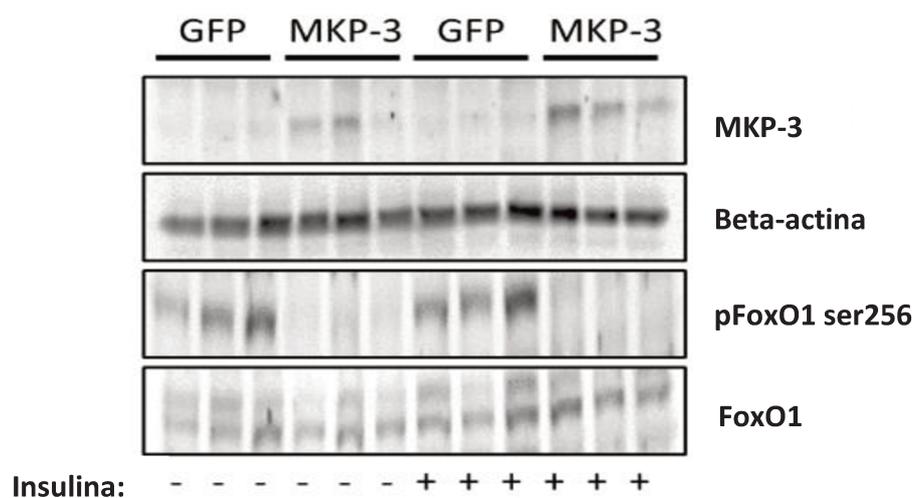


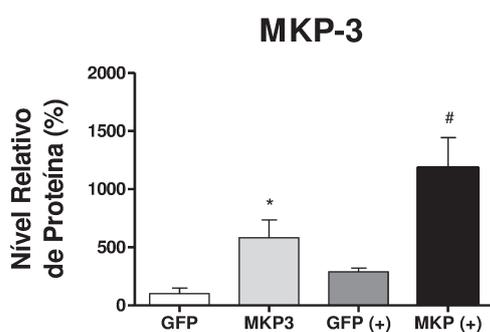
Figura 16. Teste de expressão por *Western Blot* anti-MKP-3 de células HEK293 transfectadas com pAdeno-X-MKP-3 e pAdeno-X-EGFP; e células não transfectadas (controle).

Depois de confirmadas as clonagens, os vetores virais foram obtidos em células HEK293, purificados e devidamente quantificados. Em seguida, células HEK293 foram infectadas com vetores adenovirais de MKP-3 e posteriormente tratadas com insulina (10 ng /ml) durante 15 minutos. Após o procedimento houve a extração de proteína para análises de *Western Blot* das proteínas de interesse (Figura 17). Observamos a superexpressão da MKP-3 e nenhuma diferença na beta-actina entre os grupos, além de uma diminuição da fosforilação de FoxO1 em células que superexpressam MKP-3, independentemente do estímulo de insulina, indicando um papel desta proteína para a desfosforilação de FoxO1.

A



B



C

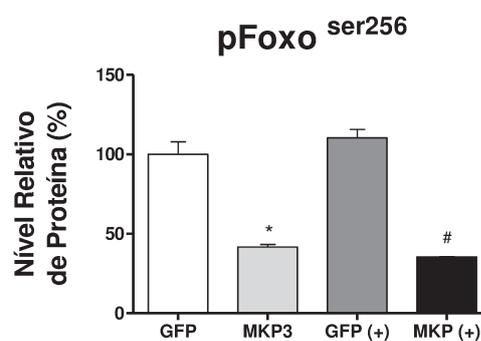


Figura 17. A superexpressão de MKP-3 reduz a fosforilação de FoxO1 em células HEK293. (A) Representação da superexpressão de MKP-3 em células HEK293 infectadas com Ad-MKP-3 ou Ad-EGFP e tratadas (+) ou não tratadas com insulina (-). (B) Aumento da expressão da proteína MKP-3 em comparação com seu controle de EGFP em ambos os tratamentos + e - insulina. (C) Nas mesmas amostras e com os mesmos tratamentos, a fosforilação de FoxO1 foi analisada, observando uma diminuição em relação ao seu respectivo controle (EGFP ou EGFP (+)). Os resultados são expressos como média e erro padrão da média (SEM) de dois experimentos em triplicata. * $P < 0,05$ vs. EGFP; # $P < 0,05$ vs EGFP (+).

Após realizados os ensaios in vitro em células HEK293, foi realizada a microinjeção dos adenovírus obtidos no hipotálamo de camundongos Swiss. Para confirmar a injeção, foi feita a colocalização deste vírus na região do terceiro ventrículo confirmando o aumento da expressão de MKP-3 na região de interesse (Figura 18).

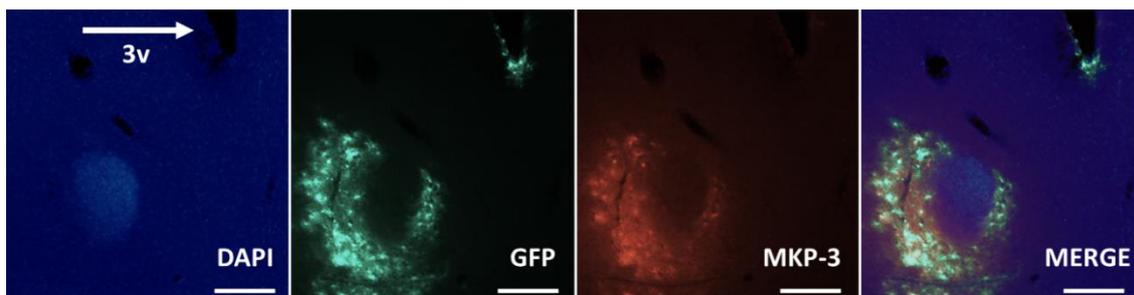


Figura 18. Imagens de imunofluorescência da localização do Ad-MKP-3 no hipotálamo. Os núcleos são corados de azul usando 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Visualização do EGFP (coloração verde) em núcleos próximos do terceiro ventrículo (3V), MKP-3 (vermelho) e mesclado (amarelo) em ratos suíços (ampliação: 20 ×).

Em relação à fosforilação das proteínas envolvidas com a atividade da fosfatase MKP-3 *in vivo*, verificamos que após o estímulo da insulina houve redução da fosforilação da FoxO1 em animais tratados com o adenovírus MKP-3. Esse fato demonstra um importante papel da MKP-3 na desfosforilação do FoxO1, uma proteína chave envolvida no metabolismo energético, *in vivo* (Figura 19). Além disso, não houve diferença entre os grupos para a fosforilação de Akt, indicando que não há interferência do aumento de MKP-3 na fosforilação de Akt.

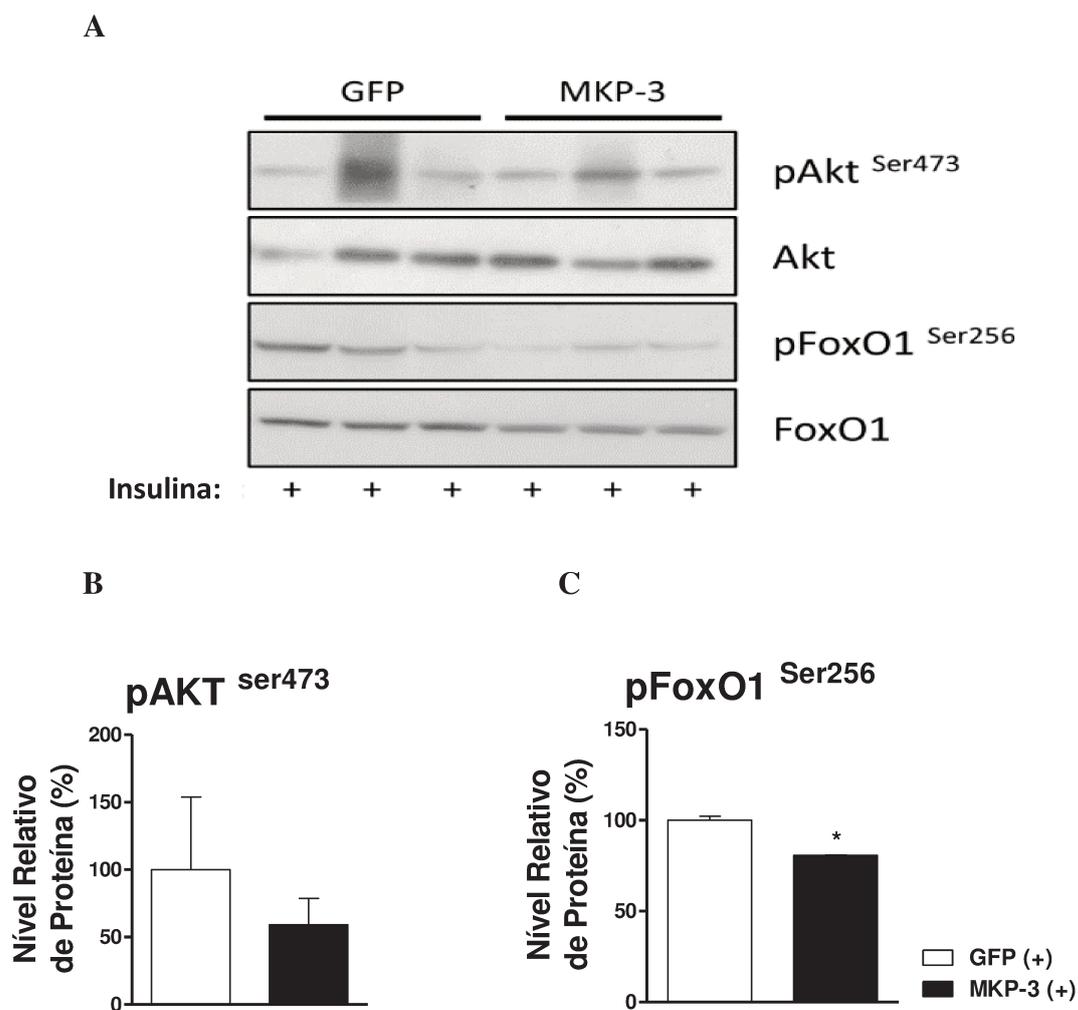


Figura 19. Injeção do vetor adenoviral de MKP-3 no hipotálamo diminui a fosforilação de FoxO1 em camundongos swiss. Representação de bandas de pAkt e Akt, pFoxO1 e FoxO1 (A). Apresentação do conteúdo proteico de pAkt (B) e pFoxO1 (C) em animais EGFP e MKP-3 estimulados com insulina via i.c.v. Dados relativos à média e erro padrão da média (SEM) de cada grupo experimental, de duas experiências em triplicata, * $P < 0,05$ vs EGFP (+); (EGFP, $n = 4$); (MKP-3, $n = 3$).

Estes resultados sobre a ação da MKP-3 no hipotálamo são pioneiros e de grande importância, visto que na condição da obesidade, verificam-se distúrbios hipotalâmicos e hiperfagia.

Após nossos resultados em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica apresentarem aumento do conteúdo proteico de MKP-3, assim como a menor resposta na fosforilação de Foxo1 e de Erk1/2 como mediadoras da sinalização da insulina, foram obtidos resultados referentes ao efeito do exercício físico agudo de natação sobre a proteína MKP-3 e proteínas de interesse na condição de obesidade.

Na Figura 20 observamos a evolução da massa corpórea dos animais durante oito semanas de experimento. O grupo que recebeu a dieta rica em gordura teve maior aumento na massa corpórea total em relação a seus grupos controles.

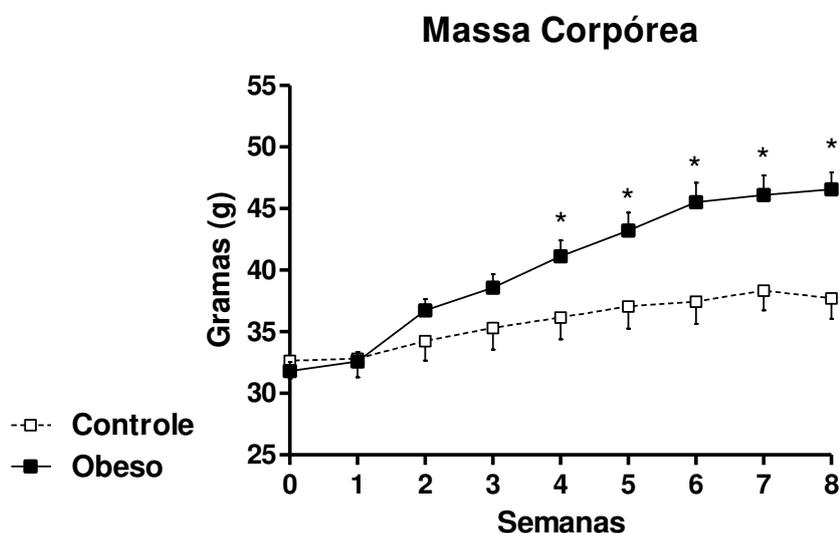


Figura 20. Valores referentes a massa corporal total dos animais dos grupos controle (magro) e obeso (n=5). Dados referentes às médias e erro padrão da média de cada grupo experimental. * diferente do grupo controle, $p < 0.05$.

Nossos próximos ensaios foram realizados com animais obesos não exercitados e animais obesos exercitados. Na figura 21 foram apresentados os resultados referentes à massa corpórea dos grupos controle obeso sedentário e obeso exercitado. Observamos que o grupo obeso apresentou maior massa corpórea e quantidade de tecido adiposo quando comparados ao controle, porém não há diferença para esses parâmetros entre os grupos obeso e obeso exercitado.

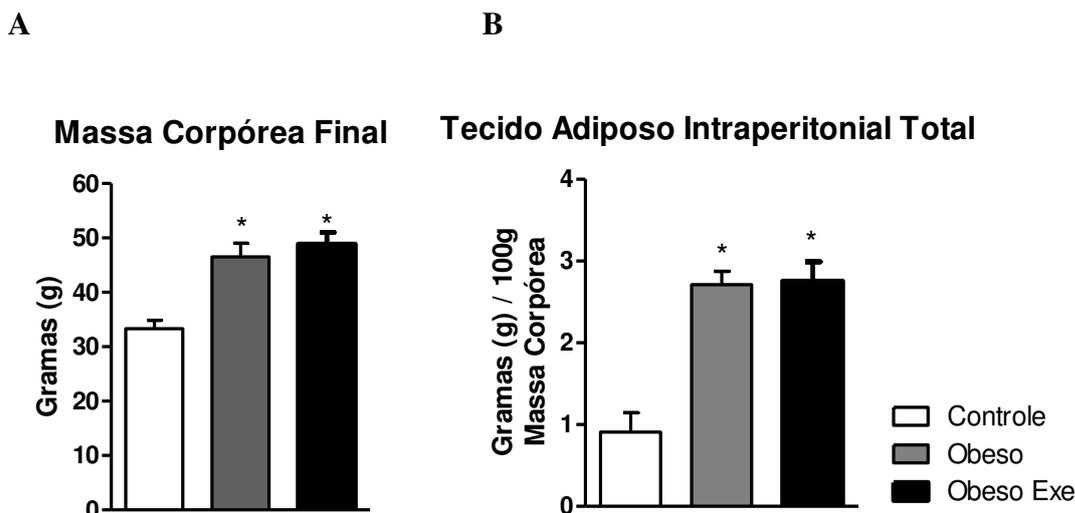


Figura 21. Valores referentes ao ganho da massa corpórea total (A). Ganho de gordura epididimal dos animais dos grupos controle, obeso e obeso exercitado (B). As barras presentes nos gráficos representam à média e o erro padrão da média (SEM) (n=5). * $p < 0.05$ versus grupo controle.

Em adição, na figura 22, observamos que em condições de obesidade, a proteína MKP-3 está aumentada em relação ao grupo controle (Figura 16A). O protocolo de exercício agudo utilizado não foi capaz de suprimir o conteúdo de MKP3 no hipotálamo quando comparado ao grupo obeso não exercitado (Figura 16B). Ao contrário, verificou-se que o conteúdo de MKP-3 foi maior em resposta ao exercício se comparados aos camundongos que não foram submetidos ao protocolo de exercício no mesmo período.

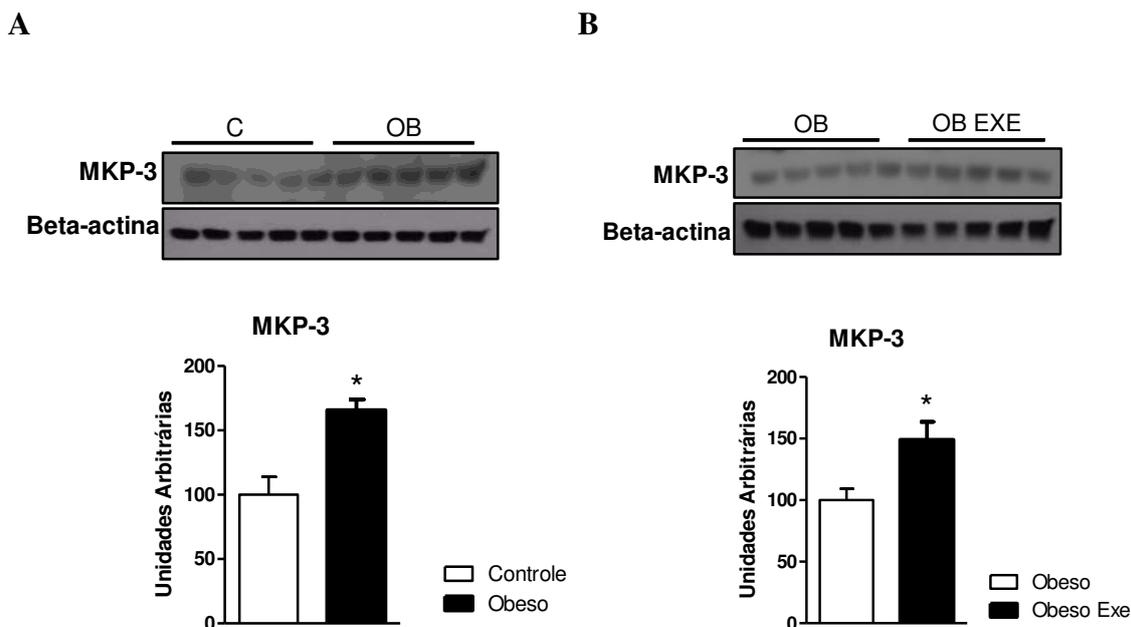


Figura 22. Expressão da proteína MKP-3 em hipotálamo de animais controles e obesos induzidos por dieta rica em gordura (A). Expressão da proteína MKP-3 em hipotálamo de animais obesos sedentários e obeso exercitado (B). As barras presentes nos gráficos representam à média e o erro padrão da média (SEM) (n=5). * $p < 0.05$ versus grupo controle.

A seguir, após a cirurgia estereotáxica e implante da cânula no terceiro ventrículo, houve injeção de insulina i.c.v e análise da fosforilação e conteúdo total de proteínas importantes na via de sinalização da insulina. Ao comparar a fosforilação da Akt e FoxO1 verificamos que não ocorreu diferença significativa entre os grupos estudados após estímulo com insulina (Figura 23).

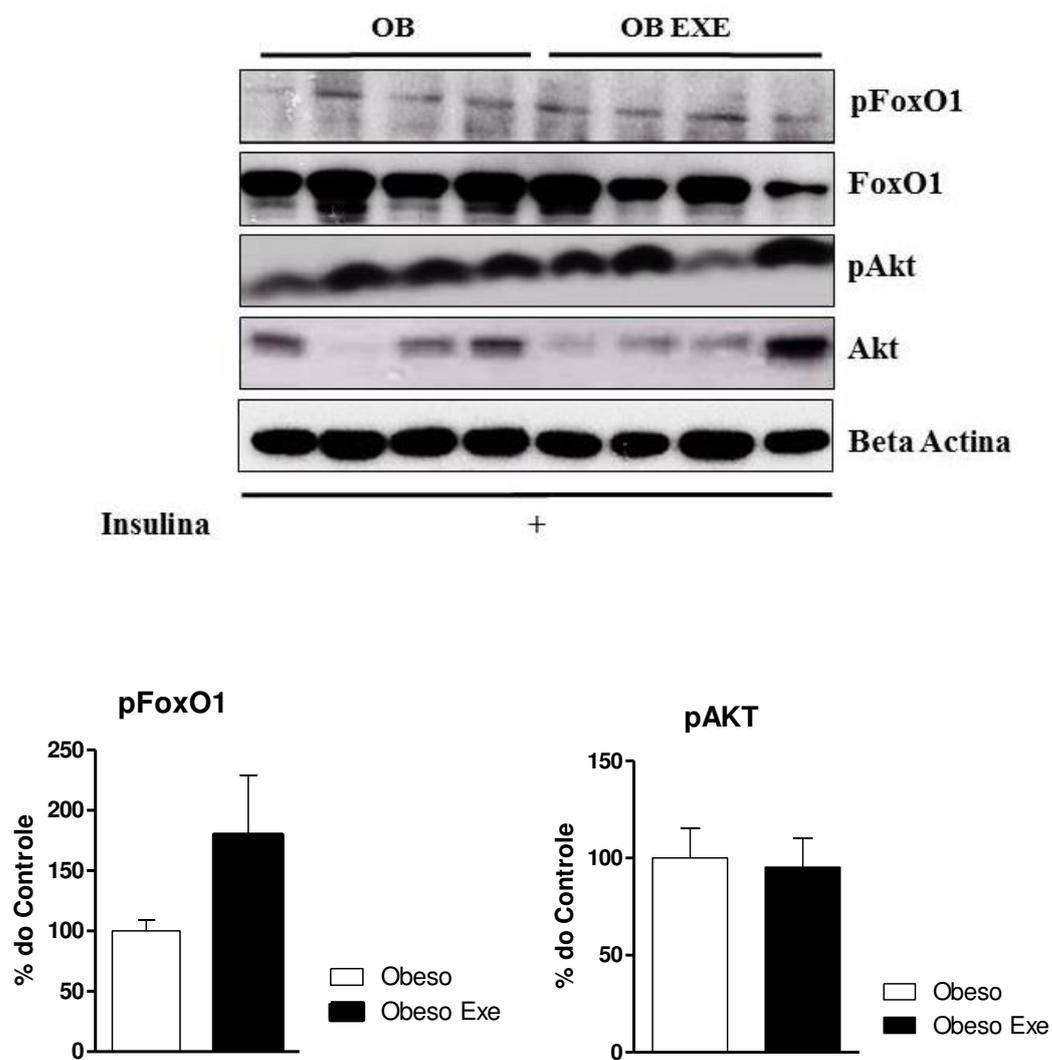


Figura 23. Conteúdo total e de fosforilação de Akt e Foxo1 no hipotálamo de animais obesos induzidos por dieta rica em gordura sedentários e exercitados. As barras presentes nos gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) (n=5). *p<0.05 versus grupo controle.

6. DISCUSSÃO

A sinalização da insulina no hipotálamo tem papel importante no equilíbrio do balanço energético e manutenção da massa corporal total. Através da proteína Akt e fosforilação do fator transcricional FoxO1, a insulina regula a expressão de neuropeptídeos orexigênicos como NPY e AgRP no hipotálamo. Condições em que ocorrem distúrbios na sinalização da insulina observa-se aumento da fome e da adiposidade corporal (VELLOSO., 2006). Reconhecidamente a oferta de uma dieta rica em gordura saturada e hipercalórica está associada com prejuízos na sinalização da insulina, fosforilação e exclusão da FoxO1 em neurônios hipotalâmicos, induzindo a hiperfagia (ROPELLE et al., 2009; CINTRA et al., 2012) . Os mecanismos atrelados a esta desregulação ainda não são totalmente conhecidos. Em nosso estudo, demonstramos que a MKP-3 pode ser uma molécula de ação prejudicial no controle da fome exercido pela insulina pela ação em desfosforilar diretamente a FoxO1 hipotalâmica. Tantos os experimentos realizados com animais, quanto em células, permitem apontar que o aumento de MKP-3 no hipotálamo prejudica a ação da insulina sobre a FoxO1. Os experimentos in vivo mostram que isso está relacionado a um aumento na ingestão alimentar.

Previamente, verificou-se que uma dieta rica em gordura inibe a fosforilação e a posterior degradação de FoxO1 induzida pela insulina, aumentando sua atividade nuclear e a hiperfagia em ratos (ROPELLE et al., 2009). Em contraste, foi demonstrado que o tratamento com oligonucleotídeo antisense (ASO) da FoxO1 bloqueou o efeito orexigênico da insulina no hipotálamo, e impediu a resposta hiperfágica nestes animais (ROPELLE et al., 2009). No presente estudo relatamos que animais obesos, induzidos por dieta, apresentam aumento do conteúdo proteico de MKP-3, assim como menor resposta na fosforilação da FoxO1 como mediadora da sinalização da insulina.

O mecanismo de ação da MKP-3 sobre a FoxO1 tinha sido previamente demonstrado na literatura, no qual o estado de obesidade está estritamente relacionada com o aumento do conteúdo de MKP-3 em tecidos da periferia, tanto em modelos transgênicos (*ob/ob*) (WU et al., 2010), como através da indução por dieta rica em gorduras (WU et al., 2010; JIAO et al., 2012). Entretanto, este mecanismo envolvendo desfosforilação da FoxO1 hipotalâmica pela MKP-3, ainda não havia sido estudado na condição de obesidade.

MAP-quinase da fosfatase 3 (MKP-3), que é também conhecida como proteína fosfatase de especificidade dual 6 (DUSP6), pertencente a uma importante família de proteínas fosfatases. Estas fosfatases inativam membros da proteína ativada por mitogénio (MAP) membros da família quinase (ERK, JNK, p38) por desfosforilação (CAMPS et al., 2000; DICKINSON et.al., 2006). Em um estudo que investigou a atividade da MKP-3 *in vitro* apontaram que ela pode apresentar diferentes preferências de substratos de acordo com o tipo de célula e condição fisiológica na qual se encontra (NDONG et al., 2014).

Observa-se que MKP-3 é um mediador importante na homeostase da glicose através da promoção da gliconeogênese hepática (WU et al., 2010). O efeito desta sobre a produção de glicose hepática é encontrado através de desfosforilação e ativação de FoxO1, um fator de transcrição com um papel bem estabelecido na gliconeogênese e na diminuição da sensibilidade à insulina hepática. MKP-3 interage com FoxO1 e promove a sua translocação nuclear por desfosforilação na serina 256 (WU et al., 2010). Inibição de MKP-3 no fígado de animais obesos induzidos por dieta e ob/ob é suficiente para atenuar hiperglicemia relacionada com a obesidade e melhorar a sensibilidade à insulina sistêmica, maior gasto energético e menor adiposidade corporal e hepática, quando comparados a animais selvagens na mesma dieta (WU et.al., 2010; PAULI et.al., 2014).

Desta maneira, também é consenso que a fosforilação da FoxO1 é reduzida nesta condição patológica, podendo a MKP-3 ser uma proteína chave para este fenômeno. Uma das principais proteínas responsáveis por fosforilar e inativar a FoxO1 após o estímulo de insulina é a Akt (RODRIGUES et al., 2015; ROPELLE et al., 2010). Reconhecidamente um dos principais distúrbios moleculares hipotalâmicos atribuídos à obesidade é a incapacidade da insulina propagar seu sinal intracelular, resultando em menor fosforilação da Akt (RODRIGUES et al., 2015; ROPELLE et al., 2010), conforme os achados do presente estudo. A fosforilação da FoxO1 pela Akt resulta em sua extrusão nuclear e sua consequente degradação. (RODRIGUES et al., 2015; ROPELLE et al., 2010).

Nossos resultados apresentam que, a proteína MKP-3 também é uma das principais reguladoras (por desfosforilação) da FoxO1 e da Erk (JUREK et al., 2009; FENG et al., 2012; NDONG et al., 2014; FENG; HE; XU et al., 2014; FENG et al., 2014). Estudos sugerem que no hipotálamo FoxO1, se aponta como um importante substrato da MKP-3 de acordo com o tipo de célula e condição fisiológica na qual se

encontra o organismo (RAHMOUNI et al., 2009). Além desta, a insulina também atua na ativação da via MEK/pErk, contribuindo para a inibição da transcrição de NPY/AgRP (MAYER; BELSHAM., 2009; RAHMOUNI et al., 2009). A fosforilação da Erk hipotalâmica também apresenta grande importância sobre o metabolismo energético, uma vez que ela é necessária para a regulação da termogênese (RAHMOUNI et al., 2009).

A administração de inibidor farmacológico da Erk em células hipotalâmicas (mHypoE-46) prejudicou a capacidade da insulina em reduzir os níveis de NPY e AgRP RNAm (MAYER; BELSHAM., 2009). Análises de sítios de ligação de fatores transcricionais revelaram que, após a fosforilação pelo estímulo da insulina, a Erk ativa fatores de transcrição capazes de se ligar a regiões regulatórias de NPY e AgRP 5', reprimindo assim a transcrição gênica destes neuropeptídeos orexigênicos (MAYER; BELSHAM., 2009). Ademais, a fosforilação da Erk hipotalâmica está relacionada ao aumento da termogênese e, por outro lado, após sua inibição farmacológica, ocorreu redução da termogênese e da ativação do tecido adiposo marrom pelo hipotálamo (RAHMOUNI et al., 2009).

Sendo assim, visto o importante papel da FoxO1 e da Erk no controle da ingestão alimentar, nós avaliamos o comportamento da fosforilação destas duas proteínas em resposta ao estímulo de insulina em animais controles e obesos. Foi observado que animais obesos demonstraram no hipotálamo tanto aumento do conteúdo de MKP-3 como diminuição da fosforilação da FoxO1 e da Erk1/2. Estes dados sugerem a atividade fosfatase da MKP-3 sobre estes alvos no tecido hipotalâmico na condição de obesidade.

Além disso, nós investigamos se estes mecanismos moleculares estavam atrelados a alterações metabólicas e fisiológicas na condição de obesidade. Observamos que a ingestão alimentar dos animais obesos foi maior durante um período de 12h após o estímulo de insulina. Tais distúrbios foram acompanhados por aumento no peso e adiposidade corporal, menor sensibilidade à insulina e intolerância a glicose nos animais obesos.

Para reforçar os achados na literatura, nós avaliamos o efeito da superexpressão da proteína MKP-3 em células HEK293 visando sua ação fosfatase sobre a proteína FoxO1. Posteriormente, para confirmar esta ação *in vivo*, foi injetado no hipotálamo de camundongos Swiss um vetor adenoviral carregando o gene da MKP-3. Nossos resultados confirmam que após a transfecção com plasmídeo adenoviral, foi encontrado

um importante aumento na MKP-3 em relação ao grupo EGFP e o CTL nas células HEK293. Para avaliar o efeito da superexpressão da MKP-3 em algumas proteínas envolvidas com os sinais intracelulares da insulina, as células foram tratadas com insulina. Sendo assim, ficou evidente em nossos resultados que o estímulo de insulina aumentou a fosforilação da FoxO1 e que o aumento de MKP-3 está relacionado com a menor fosforilação da FoxO1 em células HEK293, mesmo após o estímulo de insulina. Este comportamento da pFoxO1 em apresentar redução da fosforilação, demonstrou ser um alvo importante da atividade fosfatase da MKP-3 em células HEK293.

Para avaliar se estas evidências se perpetuam *in vivo*, Ad-MKP3 foi injetado diretamente no hipotálamo de camundongos Swiss alimentados com dieta padrão, com o objetivo de entender o papel da MKP-3 sobre uma importante estrutura reguladora da homeostase energética. Observamos através da técnica de imunofluorescência que a microinjeção do vetor adenoviral da MKP-3 atingiu a região do terceiro ventrículo e isso foi acompanhado por significativa redução da FoxO1 mesmo após o estímulo com insulina, confirmando os nossos dados primeiramente encontrados em células HEK293.

O entendimento da ação da MKP-3, tanto em meio celular como no tecido hipotalâmico, poderá ampliar o conhecimento sobre biomoléculas de efeito sobre o controle da fome e abrir portas para novos alvos terapêuticos. Um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa demonstrou o aumento da MKP-3 na condição de obesidade em reduzir a fosforilação da FoxO1 no tecido hepático, levando ao descontrole da produção hepática de glicose pela insulina (PAULI et al., 2014). Por fim, esta proteína se relaciona através de uma regulação recíproca, podendo atuar sobre importantes regulações fisiológicas envolvendo o metabolismo energético.

Outro dado interessante foi demonstrado por Ndong et al. (2014), onde foi observado que a condição fisiológica da célula pode regular a preferência de substratos da proteína MKP-3. Ao administrar lipopolissacarídeos (LPS), estimulando uma reação pró-inflamatória em astrócitos com superexpressão de MKP-3, houve uma preferencial redução da pJNK do que comparado a da pERK extrema importância, visto que o hipotálamo é um órgão fundamental para manter a homeostase energética, e a desregulação deste mecanismo ocorre em condições de síndrome metabólica, obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2 (TRAN et al., 2016; ARRUDA et al., 2011).

Essas evidências sugerem um novo mecanismo pelo qual a proteína MKP-3 poderia modular outras regiões e neurônios específicos no hipotálamo envolvido com a homeostase energética. Com isso, cabe aos próximos estudos avaliarem a preferência de

substrato para a atividade fosfatase da MKP-3 na condição de obesidade e outras síndromes metabólicas. O entendimento destes mecanismos é necessário para o desenvolvimento de estratégias eficazes em situações de patologias envolvendo a desregulação desta via molecular. Nossos achados contribuem com novas evidências sobre os mecanismos moleculares hipotalâmicos envolvidos no desbalanço da homeostase energética e da ingestão alimentar na condição de obesidade e resistência à insulina. Portanto, tomando em conjunto nossos resultados, pode-se considerar que o aumento de MKP-3 no hipotálamo, no mínimo em parte, contribui com distúrbios na via de sinalização da insulina através do seu efeito em desfosforilar a FoxO1 e Erk, induzindo hiperfagia e obesidade nos animais.

Buscamos também investigar os efeitos do exercício físico sobre esta fosfatase. Após a sessão de exercício, foram analisados os resultados entre os animais obesos e obesos exercitados agudamente. Como esperado, não houve diferença nas variáveis corporais após o exercício por tratar-se de apenas uma sessão de exercício de natação. Nos aspectos moleculares, foi encontrado aumento do conteúdo proteico de MKP-3 nos animais obesos quando comparados aos animais controle, e esse comportamento foi reproduzido com o grupo obeso exercitado, assim como um decorrente aumento na fosforilação de Foxo1 que estão atenuadas nos animais obesos, mesmo na presença de insulina.

O exercício físico induz à produção e secreção de miocinas durante a contração. Essas moléculas podem induzir alterações metabólicas em outros tecidos ou órgãos, como fígado, tecido adiposo, pâncreas e hipotálamo (KOH et al., 2006). A resposta anti-inflamatória mediada pelo exercício é realizada por IL-10, receptor de IL-1, antagonista (IL-1ra), receptores de TNF solúveis (sTNF-R) e principalmente por IL-6 (PICARDI et al., 2010). IL-6 é frequentemente classificado como uma citocina pró-inflamatória, embora dados consistentes também demonstraram que a IL-6 induz uma resposta anti-inflamatória e pode atenuar a inflamação das respostas de fase aguda (PICARDI et al., 2010). Recentemente, mostramos que o exercício físico reduz a hiperfagia em animais obesos pela redução hipotalâmica de IKK beta/ NF- κ B e ativação do estresse ER por meio da atividade anti-inflamatória IL-6 e IL-10 (ROPELLE et al., 2010). Os efeitos anti-inflamatório do exercício evidenciados pela produção de IL-6 e IL-10 foram observados em diferentes modelos de roedores e humanos (LIU et al., 2011; ROPELLE et al., 2006; BÄCKBERG et al., 2004).

No presente estudo, buscamos mostrar um novo mecanismo pelo qual a dieta rica em gordura prejudica a sensibilidade hipotalâmica da insulina e leva à hiperfagia e obesidade. E o papel do exercício físico como importante ferramenta não farmacológica regulando esta via. A literatura destaca que dentre as principais proteínas desfosforiladas pela MKP-3 em diferentes tecidos estão FoxO1 (MAYER, BELSHAM et al., 2009; FENG et al., 2012), ERK e JNK (RAHMOUNI et al., 2009; PAULI et al., 2014), todas envolvidas na via de sinalização da insulina. Especialmente a fosforilação da ERK é demonstrada como um dos principais mecanismos de inativação da MKP-3 (NDONG et al., 2014; PAULI et al., 2014) e a sinalização intracelular da insulina pode ser um dos principais gatilhos para este processo (NDONG et al., 2014). Sendo assim, especula-se uma fina interação entre a atividade da MKP-3 e a via da insulina. Contudo, ainda não se encontra dados na literatura que evidenciam a ação e consequência do aumento desta proteína no sistema nervoso central, e sua relação com o exercício físico.

Além disso, um estudo prévio do nosso laboratório mostrou o importante efeito do exercício físico como uma ferramenta não farmacológica por alterar a expressão, ou a atividade, das proteínas envolvidas na transdução do sinal da insulina em hipotálamo. No estudo de Ropelle (2010), após estímulo com insulina em roedores submetidos a uma sessão aguda de exercício de natação, observou-se redução na ingestão alimentar, assim como as infusões intracerebroventriculares de leptina ou insulina reduziram a ingestão alimentar nos animais exercitados de forma mais acentuada do que se observou nos animais sedentários. A Leptina ou insulina estimulou a fosforilação das proteínas IRS-1/2, assim como as associações destes substratos com a fosfatidil-3-quinase (PI3q), melhorando o sinal da Akt e Foxo1. Observou-se também que a fosforilação hipotalâmica da Akt foi menor nos animais sedentários se comparados aos exercitados (WU et al., 2010). Um outro estudo também de nosso grupo de pesquisa demonstrou a eficiência do exercício físico em atenuar a MKP-3 e aumentar a pFoxO1 no tecido hepático, melhorando o controle da produção hepática de glicose pela insulina (PAULI et al., 2014).

No entanto, as ações do exercício sobre a MKP-3 no hipotálamo são totalmente desconhecidas, sendo necessários mais estudos sobre o papel dela no sistema nervoso central. Visto que a hipótese inicial do nosso trabalho é que o exercício físico seria capaz de reduzir o conteúdo de MKP-3 e isso levaria a um aumento da ação da Akt sobre a FoxO1, diminuição da ingestão alimentar, e isso não foi confirmado. Pretende-se fazer outros ensaios para confirmar esses resultados. Uma possibilidade é que o

aumento da MKP-3 em resposta ao exercício possa estar associado preferencialmente com outras proteínas específicas, como a JNK, talvez, não seja tão imprescindível a MKP-3 estar aumentada em resposta ao exercício. Portanto, experimentos com superexpressão ou inibição da MKP-3 em animais exercitados poderão contribuir para elucidar esta questão. Além disso, a investigação do efeito de diferentes protocolos de exercício e tempo mais longo de extração do hipotálamo após o exercício poderão auxiliar no entendimento da regulação da MKP-3 através do exercício. Por fim, um número maior de ensaios se mostram necessários para confirmação desses achados do presente estudo.

Levando em conta as limitações do presente estudo e os achados observados, pode-se considerar que a MKP-3 no hipotálamo participa negativamente do controle da fome. Esses dados levam a crer que implicações envolvendo o aumento da atividade da proteína MKP-3 no hipotálamo podem colaborar com os distúrbios associados à ingestão alimentar na condição de obesidade e de resistência à insulina no hipotálamo.

Os dados encontrados nas etapas do trabalho irão consolidar cada vez mais a importância deste mecanismo no controle energético e metabólico, prevenindo e atenuando a resistência à insulina em condições de obesidade. São escassos na literatura, resultados que propõem ação da MKP-3 no SNC, sendo que se faz necessário avaliar mais a fundo seus mecanismos de ativação, assim como seu papel na ingestão alimentar e a influência de diferentes protocolos de Exercício Físico. A seguir, na figura abaixo, estão ilustrados os resultados encontrados durante os experimentos.

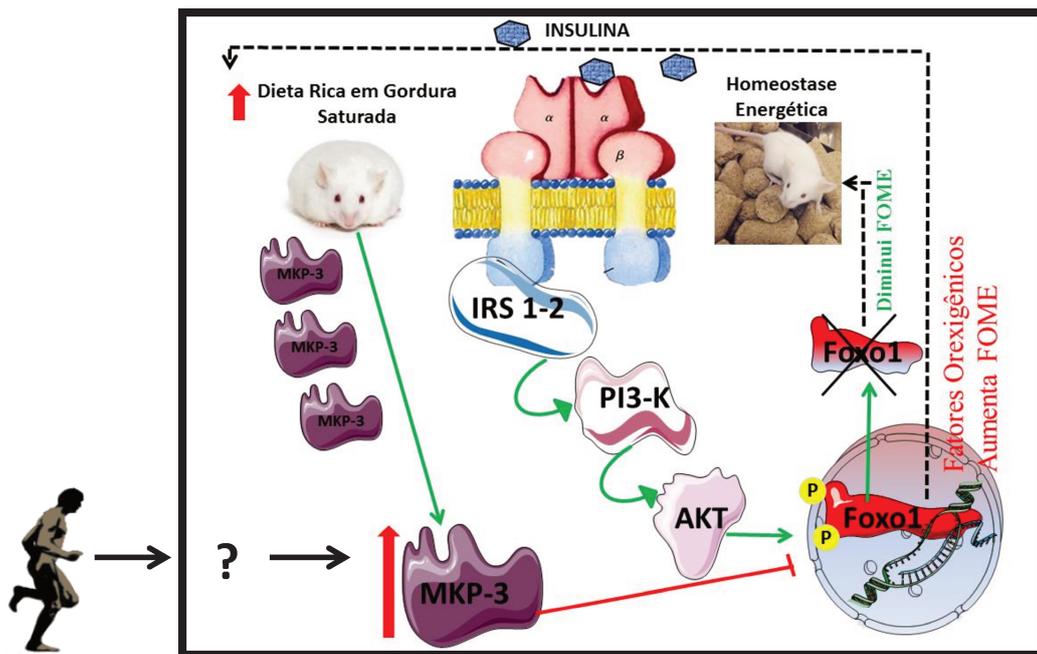


Figura 24. Esquema Ilustrativo da via de sinalização da insulina e do mecanismo pelo qual a obesidade aumenta o conteúdo proteico de MKP-3, e resulta no aumento da ingestão alimentar por desfosforilação da Foxo1 em hipotálamo de camundongos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou o aumento do conteúdo proteico da proteína MKP-3 no hipotálamo na condição de obesidade induzida por dieta rica em gordura saturada. E consequente prejuízo na fosforilação da proteína FoxO1 na via de sinalização de insulina. Ademais, os resultados obtidos mostram que em ensaios com superexpressão da MKP-3 tanto em células HEK293 como no tecido hipotalâmico de camundongos controle estão associadas à diminuição da fosforilação da FoxO1 e da Erk1/2. Estes resultados foram acompanhados por aumento na ingestão alimentar e da massa corporal total e adiposa dos camundongos. Estas novas evidências ampliam o conhecimento sobre os mecanismos de ação molecular envolvidos com os distúrbios associados à ingestão alimentar na condição de obesidade em roedores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARRUDA A.P, MILANSKI M, COOPE A, et al. Low-Grade Hypothalamic Inflammation Leads to Defective Thermogenesis, Insulin Resistance, and Impaired Insulin Secretion. *Endocrinology*. Apr;152(4):1314–26. 2011.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*. v.358, p.221-229, 2001.

BÄCKBERG M, MADJID N, OGREN SO, MEISTER B. Down-regulated expression of agouti-related protein (AGRP) mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus of hyperphagic and obese tub/tub mice. *Brain Res Mol Brain Res*.125:129–139. 2004.

BERTHOUD, H.R. "Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance." *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 197S-200S. 2006.

BI S, SCOTT K.A., HYUN J, et al. Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka long evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. *Endocrinol*. 146: 1676-1685, 2005.

BOTEZELLI, J.D., COOPE A, GHEZZI A.C., et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep*. Nov 4;6(1):31106. 2016

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BRUNING, J. C., GAUTAM, D., et al. "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." *Science* 289(5487): 2122-2125. 2000.

CAMPS, M., A. NICHOLS, et al. "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function." *FASEB J* 14(1): 6-16. 2000.

CARVALHEIRA J.B., et al. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes. Res*.13:48–57. 2005.

CARVALHEIRA, J.B.,RIBEIRO, E.B., et al. "Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats." *Diabetologia* 46(12): 1629-1640. 2003.

CARVALHEIRA, J.B., SILOTO, R.M., et al. "Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus." *FEBS Lett* 500(3): 119-124. 2001.

CHIARREOTTO-ROPELLE, E.C., PAULI, L.S., et al. "Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(5): E649-659. 2013.

CHIBALIN AV, YU M, RYDER JW, et al. Exercise induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 38-43, 2000.

CINTRA, DE., ROPELLE, E.R., et al. "Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin, leptin and physical exercise." *Rev Neurol* 45(11): 672-682. 2007.

CINTRA DE, ROPELLE ER, MORAES JC, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*, vol. 7, no. 1, pp. e30571, 2012.

COPPARI R, RAMADORI G AND ELMQUIST JK. The role of transcriptional regulators in central control of appetite and body weight. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, vol. 5, no. 3, pp.160-166, 2009.

DA LUZ G, FREDERICO MJ, DA SILVA S, et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J ApplPhysiol*,vol. 111, no. 9, pp.:2015-23, 2011.

DA SILVA AS, PAULI JR, ROPELLE ER, et al. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. 42: 2180-2188, 2010.

DATE, Y., MURAKAMI, N., et al. "The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats." *Gastroenterology* 123(4): 1120-1128. 2002.

DE SOUZA CT, ARAUJO EP, BORDIN S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, vol. 146, no. 10, pp. 4192-4199, 2005.

DE SOUZA, C. T., FREDERICO, M.J., et al. "Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice." *J Physiol* 588(Pt 12): 2239-2253. 2010.

DICKINSON RJ, KEYSE SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci*. 119:4607-4615. 2006.

DU K, HERZIG S, KULKAMI RN AND MONTMINY M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*, vol. 300, no. 5625, pp. 1574-1577, 15. 2003.

ENRIORI P.J, EVANS A.E, SINNAYAH P, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab*. 5:181-94. 2007.

FAN, W., BOSTON, B.A., KESTERSON, R.A., et al., Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-8. 1997.

FENG B, HE Q, XU H. FOXO1-dependent up-regulation of MAP kinase phosphatase 3 (MKP-3) mediates glucocorticoid-induced hepatic lipid accumulation in mice. *Mol Cell Endocrinol.*393(1–2):46–55. 2014.

FENG B, JIAO P, HELOU Y, et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 3 (MKP-3)-Deficient Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity. *Diabetes.* Sep 1;63(9):2924–34. 2014.

FENG B, JIAO P, YANG Z, XU H. MEK/ERK pathway mediates insulin-promoted degradation of MKP-3 protein in liver cells. *Mol Cell Endocrinol.* Sep 25;361(1–2):116–23. 2012.

FJELD, C.C., RICE, A.E., et al. "Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase." *J Biol Chem* 275(10): 6749-6757. 2000.

FLAMMENT M, HAJDUCH E, FERRÉ P AND FOUFELLE F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism*, vol. 23, no. 8, pp. 381-90, 2012.

FLIER, J.S. "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." *Cell* 116(2): 337-350. 2004.

FLORES, M.,B, FERNANDES, M.,F, et al. " Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats". *Diabetes*, vol. 55, no. 9, pp. 2554-2561. 2006.

FRUHBECK, G. "Intracellular signalling pathways activated by leptin." *Biochem J* 393(Pt 1): 7-20. 2006.

GRILL, H.J. "Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus." *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 216S-221S. 2006.

HOTAMISLIGIL D.G.S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic, *Cell.* 140(6): 900–917. doi:10.1016/j.cell.2010.02.034, March 19, 2010.

HOUMARD JA, SHAW CD, HICKEY MS, et al. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 277: E1055-60, 1999.

JIAO P, FENG B, XU H. Mapping MKP-3/FOXO1 Interaction and Evaluating the Effect on Gluconeogenesis. Gallyas F, editor. *PLoS One.* Jul 25;7(7):e41168). 2012.

JUREK, A., K. AMAGASAKI, et al. "Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation." *J Biol Chem* 284(7): 4626-4634. 2009.

KAHN, C. R. AND A. B. GOLDFINE. "Molecular determinants of insulin action." *J Diabetes Complications* 7(2): 92-105. 1993.

KIM, M. S., PAK, Y.K et al. "Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis." *Nat Neurosci* 9(7): 901-906. 2006.

KITAMURA T. *J Clin Invest.* 110: 1839-1847, 2002.

KOH HJ, ARNOLDS D.E, FUJII N, et al. Skeletal muscle-selective knockout of LKB1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases TRB3. *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 22, pp. 8217–8227, 2006.

KYRIAKIS JM, AVRUCH J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 92:689–737; 2012.

LAWRENCE MC, JIVAN A, SHAO C, et al. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res.* 18:436–442. 2008.

LIU ZJ, BIAN J, ZHAO YL, et al. Lentiviral vector mediated knockdown of SOCS3 in the hypothalamus protects against the development of diet-induced obesity rats. *Diabetes Obes Metab.* 2011.

LUCIANO E, CARNEIRO EM, CARVALHO CR., et al., Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol* 147:149–157.2002.

MAILLET, M., N. H. PURCELL, et al. "DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility." *J Biol Chem* 283(45): 31246-31255. 2008.

MARKS, J. L., D. PORTE, JR., et al. "Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization." *Endocrinology* 127(6): 3234-3236. 1990.

MARTINS C, MORGAN L AND TRUBY H. A review of the effects of exercise on appetite regulation: an obesity perspective. *International Journal of Obesity*, 1337–1347. 2008.

MARTINS C, ROBERTSON MD, MORGAN LM. Effects of exercise and restrained eating behaviour on appetite control *Proceedings of the Nutrition Society.* 67, 28–41 2008.

MAYER CM, BELSHAM DD. Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol.* Aug 13;307(1–2):99–108. 2009.

MILANSKI M, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci.* 2009.

MORAES JC, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One.* 4(4):e5045. 2009.

MUNZBERG, H. AND M. G. MYERS, JR. "Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance." *Nat Neurosci* 8(5): 566-570. 2005.

NDONG C, LANDRY RP, SAHA M, et al., Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-3 (MKP-3) displays a p-JNK-MAPK substrate preference in astrocytes in vitro. *Neurosci Lett.* Jul 11;575:13–8. 2014.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, v. 41, n. 1, p. 111–9, jan. 2007.

OHOKA N, YOSHII S, HATTORI T, et al., TRB3, a novel ER stressinducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO journal*, vol. 24, no. 6, pp.1243–1255, 2005.

OLIVEIRA AG, CARVALHO BM, TOBAR N, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes*. 60: 784-796, 2011

OZCAN U, CAO Q, YILMAZ E, LEE AH, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*; 306:457–461. [PubMed: 15486293], 2004.

PAULI LSS, ROPELLE ECC, DE SOUZA CT, et al., Exercise training decreases mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice. *J Physiol*. Mar 15;592(6):1325–40. 2014.

PAULI, JR, ROPELLE, ER, CINTRA, DE, et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in dietinduced obese Wistar rats. *Journal of Physiology* 586: 659–671. 2008.

PEDERSEN, B., STEENSBERG, A., FISCHER, C., et al., The metabolic role of IL-6 produced during exercise: Is IL-6 an exercise factor? *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), 263-267. 2004.

PETERSEN AM AND PEDERSEN BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology*, vol. 98, no.4, pp. 1154-1162, 2005.

PICARDI PK, CARICILLI AM, DE ABREU LL, et al. Modulation of hypothalamic PTP1B in TNF-alpha-induced insulin and leptin resistance. *FEBS Lett*. 584: 3179 3184, 2010.

PICARDI, P.K., CALEGARI, V.C., PRADA, P.O., et al., Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 149 3870-3780. 2008.

PORTE, D., JR., BASKIN, D.G et al. "Leptin and insulin action in the central nervous system." *Nutr Rev* 60(10 Pt 2): S20-29; discussion S68-84, 85-27. 2002.

RAHMOUNI K, SIGMUND CD, HAYNES WG, et al., Hypothalamic ERK Mediates the Anorectic and Thermogenic Sympathetic Effects of Leptin. *Diabetes*. Mar 1;58(3):536–42. 2009.

RODRIGUES B.D.A, PAULI L.S.S, DE SOUZA C.T, et al. Acute Exercise Decreases Tribbles Homolog 3 Protein Levels in the Hypothalamus of Obese Rats. *Med Sci Sport Exerc*. Aug;47(8):1613–23. 2015,

RODRIGUES, B.A. Overexpression of Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 (MKP-3) reduces FoxO1 phosphorylation in mice hypothalamus. *Neurosci Lett*. Oct 17;659:14-17. doi: 10.1016/j.neulet.2017.08.067. Epub 2017 Sep 1. 2017.

ROPELLE ER, PAULI JR, PRADA P, et al. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *J Physiol*. 587(Pt 10):2341-51. 2009.

ROPELLE ER, PAULI JR, PRADA PO, et al. Reversal of diet induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*. 577: 997-1007, 2006.

ROPELLE ER, FLORES MB, CINTRA DE, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS biology*, vol. 24, no. 8, pp. e1000465, 12-15, 2010.

SCHWARTZ, M. W., WOODS, S.C., et al. "Central nervous system control of food intake." *Nature* 404(6778): 661-671. 2000.

STANLEY, S., K. WYNNE, et al. "Hormonal regulation of food intake." *Physiol Rev* 85(4): 1131-1158. 2005.

THALER, J. P., C. X. YI, et al. "Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans." *J Clin Invest* 122(1): 153-162. 2012.

THIVEL D et al. The 24-h Energy Intake of Obese Adolescents Is Spontaneously Reduced after Intensive Exercise: A Randomized Controlled Trial in Calorimetric Chambers. Published: January 17, Plos On DOI: 10.1371/journal.pone.0029840. 2012

THIVEL D, et al. Gender effect on exercise-induced energy intake modification among obese adolescents. *Appetite*, Volume 56, Issue 3, Pages 658–661, June 2011.

TORSONI, M. A., J. B. CARVALHEIRA, et al. "Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E216-223. 2003.

TRAN DQ, TSE EK, KIM MH, BELSHAM DD. Diet-induced cellular neuroinflammation in the hypothalamus: Mechanistic insights from investigation of neurons and microglia. *Mol Cell Endocrinol*. Dec 15;438:18–26. 2016.

VAN DE SANDE-LEE, S., F. R. PEREIRA, et al. "Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects." *Diabetes* 60(6): 1699-1704. 2011.

VELLOSO, L. A. "The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity." *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(2): 165-176. 2006.

WADA T, PENNINGER JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 23:2838–2849. 2004.

WALLENIS, K., V. WALLENIS, et al. "Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 560-565. 2002.

WELLEN, K. E. AND G. S. HOTAMISLIGIL. "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue." *J Clin Invest* 112(12): 1785-1788. 2003.

WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, JOHNSON GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79:143–180. 1999.

WOODS, S. C., R. J. SEELEY, et al. "Signals that regulate food intake and energy homeostasis." *Science* 280(5368): 1378-1383. 1998.

WU Z, JIAO P, HUANG X, et al. MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. *J Clin Invest.* Nov;120(11):3901–11. 2010.

WYNNE, K., S. STANLEY, et al. "Appetite control." *J Endocrinol* 184(2): 291-318. 2005.

XU H, YANG Q, SHEN M, et al. Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; Oct* 28;280(43):36013–8. 2005.

ZHAO, Y. AND Z. Y. ZHANG "The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3." *J Biol Chem* 276(34): 32382-32391. 2001.