



Mariana Portovedo de Oliveira Araújo

**Modulação da autofagia hipotalâmica em camundongos
alimentados com dieta hiperlipídica**

Limeira

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

Mariana Portovedo de Oliveira Araújo

**Modulação da autofagia hipotalâmica em camundongos
alimentados com dieta hiperlipídica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas para obtenção do Título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de Metabolismo e Biologia Molecular.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO/TESTE DEFENDIDA PELO(A) ALUNO(A)
Mariana Portovedo de Oliveira Araújo
E ORIENTADA PELO(A) PROF(A). DR(A).

M. Degani
PROF. DR. MARCOS HENRIQUE DEGANI
Coordenador de Pós-Graduação
Faculdade de Ciências Aplicadas de Unicamp - Limeira
Matrícula: 296777

Orientadora: Marciane Milanski Ferreira

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

Ar15m Araújo, Mariana Portovedo de Oliveira, 1987-
Modulação da autofagia hipotalâmica em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Mariana Portovedo de Oliveira Araújo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marciane Milanski Ferreira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Autofagia. 2. Hipotálamo. 3. Obesidade. I. Ferreira, Marciane Milanski. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Modulation of hypothalamic autophagy in hypothalamus of mice fed with high-fat diet

Palavras-chave em inglês:

Autophagy

Hypothalamus

Obesity

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

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

Banca examinadora:

Marciane Milanski Ferreira [Orientador]

Vanessa Arantes

Práticia de Oliveira Prada

Data de defesa: 30-08-2013

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

Limeira, 30 de agosto de 2013

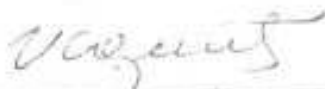
BANCA EXAMINADORA



Marciane Milanski Ferreira
Presidente da Comissão Julgadora



Prof. Dra. Patricia de Oliveira Prada



Prof. Dra. Vanessa Arantes

*Aos meus avós Leonel e Adelaide,
pelo apoio incondicional.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, meus avós, meus pais e meus tios, que me proporcionaram a educação e o discernimento necessários para a minha jornada. Aos meus irmãos, Gustavo, Mateus, Carolina, que só me trazem alegrias, e João Pedro, que mesmo com a distância está sempre “perto do coração”.

Agradeço a Marciane, cujo amor pela profissão é um exemplo para mim, que foi uma orientadora inigualável, me proporcionando grandes oportunidades.

Ao professor Lício Veloso, cuja sabedoria e excelência na profissão é admirável.

Aos meus colegas do Laboratório de Sinalização Celular e do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo, que fazem com que as horas de trabalho se tornem prazerosas.

Aos colaboradores deste trabalho, Letícia Souza, Bruna Bombassaro, Daniela Razolli, Andressa Coope, Andressa Reginato, por toda a ajuda prestada, pelos conselhos e acima de tudo, pela amizade.

Ao meu amor, Fernando Martini, por ser meu companheiro em todos os momentos e por sempre acreditar em mim.

À Raquel Leal, por me proporcionar a oportunidade de colaborar em sua pesquisa e por todo o convívio.

Aos professores Márcio Torsoni e Adriana Torsoni, motivo de grande admiração da minha parte, por serem excelentes professores, pesquisadores e pais.

À Letícia Souza e Bruna Bombassaro, por todos os momentos. Que a distância

nunca se torne maior do que a nossa amizade!

À Rafaela Benatti e Arine Melo, por todas idas e vindas à Limeira. Pela jornada compartilhada.

Às minhas eternas amigas Ana Paula Trevizan, Camila Bacan, Michelle Momesso, Daniela Moura e Laís Amaral.

Aos meus professores da graduação, pela colaboração em minha formação.

Agradeço ao Rubens e à Desirée Martini, por me acolherem na sua família.

À Erika Anne e Gerson Ferraz, pela amizade e dedicação ao laboratório. Ao Márcio Cruz, cuja competência e cuidado com os animais é notável.

Aos animais experimentais, que doam suas vidas de forma involuntária à pesquisa.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho,

Obrigada!

*"A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta.
É uma viagem, nunca uma chegada".*

Karl Popper

Resumo

O hipotálamo mediobasal é conhecido como o local primário que coordena o balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Nesse contexto, dietas com alto conteúdo de ácidos graxos saturados são apontadas como fatores dietéticos importantes responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade. Dados recentes demonstraram que a autofagia, um processo que regula a homeostase celular por degradar organelas e proteínas disfuncionais, é crucial para a manutenção da funcionalidade de neurônios hipotalâmicos AgRP e POMC, que por sua vez, são responsáveis por coordenar o balanço energético corporal. Nesse trabalho, avaliamos a distribuição e o conteúdo de proteínas da maquinaria da autofagia em um modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica com 8 ou 16 semanas de dieta e também em resposta a injeções intracerebroventriculares de ácido graxo esteárico. Demonstramos que a exposição crônica à dieta hiperlipídica levou ao aumento da expressão de marcadores inflamatórios e diminuição de autofagia. Além disso, o tratamento intracerebroventricular com ácido esteárico parece ser capaz de diminuir a autofagia em hipotálamo, sugerindo que ácidos graxos saturados podem ser os responsáveis pela diminuição da autofagia encontrada nos animais obesos. Por fim, a indução de autofagia em animais obesos com rapamicina foi capaz de melhorar a homeostase da glicose e reverter parâmetros inflamatórios e metabólicos, sem alterar o peso e a ingestão alimentar dos animais. Entender os mecanismos celulares e moleculares destes processos é crucial para identificar novos alvos terapêuticos para a obesidade.

Abstract

The mediobasal hypothalamus is known as the primary site which coordinates the balance between food ingestion and energy expenditure. In this context, diets with high content of saturated fatty acids are pointed as the main diet factor responsible for the development of obesity. Recent data have shown that autophagy, a process which regulates cellular homeostasis by degrading dysfunctional proteins and organelles, is crucial to maintain the functionality of hypothalamic AgRP and POMC neurons, which in turn are responsible for coordinate body energy homeostasis. In this study we evaluated the hypothalamic distribution and content of autophagy's machinery proteins in an animal model of diet-induced obesity at 8 or 16 weeks of high-fat diet and in response to intracerebroventricular injections of a saturated fatty acid. We demonstrate that chronic exposure to a high-fat diet can lead to an increased expression of inflammatory markers and downregulation of autophagy. Also, intracerebroventricular treatment with stearic acid appears to contribute to the decrease of hypothalamic autophagy, suggesting that saturated fatty acids can contribute to the downregulation of autophagy found in obese mice. Finally, induction of autophagy in obese mice with rapamycin was able to improved glucose homeostasis and reverse inflammatory and apoptosis markers, the main mechanisms involving dysregulation of energy balance related to hypothalamic neurons, while no weight loss was observed during the treatment. Understanding the cellular and molecular mechanisms of these processes is crucial for identifying new therapeutic targets for obesity.

Lista de ilustrações

Figura 1	Sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina.....	22
----------	--	----

Lista de abreviaturas

IR	Receptor de insulina
ObR	Receptor de leptina
NPY	Neuropeptídeo Y
AgRP	Proteína relacionada ao Agouti
POMC	Proopiomelanocortina
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
α -MSH	Hormônio estimulador dos melanócitos α
MC3R	Receptor 3 da melanocortina
MC4R	Receptor 4 da melanocortina
MCH	Hormônio concentrador de melanina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
IL1- β	Interleucina-1 β
JNK	c-Jun N-terminal cinase
IKK	Proteína cinase do inibidor do NF- κ B
PCR	Proteína C reativa
TLR4	<i>Toll Like Receptors 4</i>
RE	Retículo endoplasmático
PKC- θ	Proteína cinase C- θ
SOCS3	Proteína Supressora de Sinalização de Citocinas-3
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase-1B
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
PERK	<i>Pancreatic-ER-kinase-like ER kinase</i>
ATF6	Fator 6 ativador de transcrição
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
EIF2a	Fator iniciador eucariótico 2a
JAK2	Proteína Janus Quinase-2

PKC	Proteínas cinase C
AP-1	Proteína ativadora 1
NF-κB	Fator nuclear “capa” B
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
Lamp-2A	Proteína associada à membrana no lisossomo 2A
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	Complexo 1 da mTOR
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
PI(3)P	Fosfatidilinositol trifosfato
PI	Fosfatidilinositol
LC3B	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 B</i>
LIR	Região de interação da LC3
SNC	Sistema nervoso central

Sumário

1 Introdução.....	18
1.1 A obesidade e o controle fisiológico da fome	18
1.2 O consumo de dieta hiperlipídica e a inflamação.....	19
1.3 Mecanismos associados à patogênese da obesidade	21
1.4 Autofagia: definição, regulação e mecanismos	23
1.4 Autofagia: importância para o sistema nervoso central.....	27
2 Objetivos	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 Capítulo I: artigo científico	30
4 Discussão e conclusão.....	64
Referências	70
Anexo A - Parecer do comitê de ética em pesquisa	79
Anexo B - Co-autoria de artigos publicados	80

Introdução

1.1 A obesidade e o controle fisiológico da fome

A prevalência da obesidade aumentou dramaticamente nos últimos anos, sendo que, no mundo, mais de 1,4 bilhão de pessoas adultas estão com sobrepeso e cerca de 500 milhões são obesas (WHO, 2013). No Brasil, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009), a prevalência de excesso de peso é de 49% e de obesidade 14,8%. Tais estatísticas são alarmantes, visto que essa doença está associada com diversas alterações metabólicas e risco aumentado de desenvolvimento de hipertensão arterial, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais e até mesmo alguns tipos de câncer (WHO, 2013).

Indubitavelmente, a manutenção do peso corporal depende do balanço entre a ingestão calórica e o gasto de energia, sendo que, no hipotálamo, estão localizados neurônios responsáveis pela produção de neurotransmissores relacionados com o controle da fome e da termogênese. Nesse sistema, os hormônios leptina e insulina agem como sinalizadores dos estoques energéticos corporais para os neurônios hipotalâmicos (Velloso *et al.*, 2008; Velloso *et al.*, 2009).

No núcleo arqueado hipotalâmico estão presentes neurônios, denominados de primeira ordem, que são responsivos aos sinais periféricos que trazem informação acerca do estoque energético e que dessa forma, coordenam outros neurônios responsáveis por promoverem efeitos orexigênicos ou anorexigênicos. Tais neurônios de primeira ordem possuem diversos receptores para hormônios, dentre eles o receptor da insulina (IR) e o receptor de leptina (ObR). A ligação desses hormônios aos seus receptores controla a atividade desses neurônios hipotalâmicos. Essa população neuronal pode ser dividida em dois subgrupos: o primeiro, possui neurônios que produzem peptídeos orexigênicos, o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao Agouti (AgRP); a segunda subpopulação produz neurotransmissores anorexigênicos, o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e a proopiomelanocortina (POMC), que é clivado em hormônio estimulador dos

melanócitos α (α -MSH) e que por sua vez, age nos receptores 3 e 4 da melanocortina (MC3R e MC4R) presentes em outras regiões hipotalâmicas.

Ambas populações neuronais possuem projeções axonais para demais núcleos hipotalâmicos, como por exemplo o hipotálamo lateral e o paraventricular. No hipotálamo lateral estão presentes neurônios que produzem orexina e hormônio concentrador de melanina (MCH), ambos com atividade orexigênica. Já os neurônios do hipotálamo paraventricular, produzem hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), com atividade anorexigênica e pró-termogênica (Velloso *et al.*, 2009).

Dessa forma, em uma situação em que a oferta de nutrientes está diminuída e a concentração de insulina plasmática está baixa, como no jejum, ocorre indução de expressão de NPY e AgRP e inibição de POMC e CART. Com isso há estímulo da atividade de neurônios produtores de orexina e MCH. Em contrapartida, em uma situação em que há oferta de nutrientes e aumento de insulina circulante, como no período pós-prandial, ocorre o estímulo de neurônios produtores de POMC e CART e consequente ativação de neurônios do hipotálamo paraventricular, estimulando a expressão de TRH e CRH. Dessa forma, o hipotálamo controla de forma fisiológica o balanço energético corporal, por controlar estímulos que coordenam a ingestão alimentar e o gasto energético corporal (Velloso *et al.*, 2009).

1.2 O consumo de dieta hiperlipídica e a inflamação

Com o avanço tecnológico houve mudanças importantes no estilo de vida da população mundial. Agregado à isso, está a transição nutricional, na qual grande parte dos indivíduos aumentaram o consumo de alimentos altamente palatáveis e de alta densidade energética. Tal fato, associado a menor demanda de atividade física, é apontado como um importante fator para o aumento abrupto da prevalência da obesidade ocorrido nas últimas décadas (Kopelman, 2000; Swinburn *et al.*, 2011).

O consumo de dieta hiperlipídica leva a um aumento na expressão de citocinas inflamatórias em roedores, que por sua vez, leva à resistência à sinalização da leptina

e insulina no hipotálamo. Sendo assim, a obesidade é caracterizada por um estado de inflamação subclínica crônica (De Souza, 2005; Milanski, 2009, Velloso *et al.*, 2008, Munzberg, 2004).

A inflamação em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica foi demonstrada pela primeira vez em 1993, quando observou-se o aumento de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, em tecido adiposo de camundongos obesos (Hotamisligil *et al.*, 1993). Anos depois, demonstrou-se o aumento de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e Interleucina-1 β (IL1- β) no hipotálamo de camundongos obesos (De Souza *et al.*, 2005). Nos dias de hoje, sabe-se que a presença aumentada destas citocinas ocorre um dia após o consumo de dieta hiperlipídica (Thaler *et al.*, 2012), sugerindo que estas citocinas são produzidas localmente e de forma independente da inflamação em outros tecidos como no tecido adiposo.

A presença de citocinas inflamatórias leva à ativação de quinase c-Jun N-terminal (JNK) e da proteína cinase do inibidor do NF- κ B (IKK). Essas proteínas agem fosforilando em serina proteínas da via de sinalização de insulina. Essa fosforilação em serina consiste em uma fosforilação inibitória, levando nesse contexto, à resistência hipotalâmica à insulina. Tal fato causa uma falha na regulação da homeostase energética pelos neurônios hipotalâmicos (De Souza *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

Em humanos, a inflamação subclínica também está presente, evidenciada pelo aumento dos níveis séricos citocinas e de proteína C reativa (PCR), sendo que, a perda de peso leva à uma diminuição desses marcadores inflamatórios (Esposito *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2002, Ziccardi *et al.*, 2002). Além disso, por meio de ressonância magnética, sugere-se a presença de gliose em humanos obesos quando comparados a indivíduos eutróficos (Thaler *et al.*, 2012) e alteração no padrão de atividade neuronal após estímulo com ingestão de glicose, sendo que, a redução de peso após cirurgia bariátrica nesses indivíduos obesos reverteu apenas em parte essa atividade neuronal, sugerindo que existe uma alteração irreversível no sistema nervoso central de indivíduos obesos (Sande-Lee *et al.*, 2011).

1.3 Mecanismos associados à patogênese da obesidade

Os mecanismos que levam à inflamação relacionada ao consumo de dietas hiperlipídicas envolvem a ativação de *Toll Like Receptors 4* (TLR4), a indução de estresse de retículo endoplasmático (RE) (Milanski *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008), a ativação de proteína cinase C- θ (PKC- θ) e indução anômala da proteína Supressora de Sinalização de Citocinas-3 (SOCS3) e da proteína Tirosina Fosfatase-1B (PTP1B) (Benoit *et al.*, 2009; White *et al.*, 2009; Münzberg *et al.*, 2004).

Os TLR4 fazem parte de uma família de receptores relacionados com a resposta imune inata. Esse tipo de receptor reconhece lipopolissacarídeos presentes na parede celular de bactérias gram-negativas (Yi Xu *et al.*, 2008; Akira, Takeda, 2004). Quando ativados, os TLR4 culminam em uma cascata de sinalização que gera ativação de IKK e produção de citocinas inflamatórias (Akira, Takeda, 2004). Milanski e colaboradores (2009) demonstraram que ácidos graxos saturados de cadeia de longa levam à ativação da sinalização de TLR4, estresse de RE e resistência à leptina no hipotálamo. Demonstraram ainda, que a ativação de TLR4 é o principal mecanismo relacionado com o aumento da expressão de citocinas no hipotálamo induzido pelos ácidos graxos saturados de cadeia longa. Além disso, a ativação de TLR4 parece contribuir para a indução de estresse de retículo endoplasmático hipotalâmico (Milanski *et al.*, 2009). Recentemente, evidenciou-se que uma proteína, a fetuína A, age como um ligante endógeno de TLR4, sendo responsável pela formação do complexo entre os ácidos graxos livres e o TLR4 (Pal *et al.*, 2012).

O retículo endoplasmático é uma organela responsável pela síntese e empacotamento de proteínas, biossíntese de lipídeos e armazenamento de cálcio. Alterações na homeostase e no microambiente do RE levam ao comprometimento da capacidade dessa organela em empacotar as proteínas, levando assim, ao acúmulo em seu lúmen de agregados protéicos mal formados. Tal evento leva a uma resposta adaptativa denominada *Unfolded Protein Response* (UPR) (Szegezdi *et al* 2009; Mandl *et al* 2009; Hotamisligil, 2006). Essa resposta tem como objetivo aumentar a capacidade do RE de empacotar proteínas, por meio da ativação de proteínas envolvidas no auxílio do enovelamento proteico. A ativação da UPR se dá por meio de

três vias de sinalização: a via da *pancreatic-ER-kinase-like ER kinase* (PERK), do fator 6 ativador de transcrição (ATF6) e *inositol-requiring enzyme 1* (IRE1). As proteínas IRE1 e PERK sofrem oligomerização e autofosforilação. Como consequência, a PERK fosforila o fator iniciador eucariótico 2a (EIF2a), fato que permite o bloqueio da síntese proteica. As vias da UPR levam à indução de inflamação e, conseqüentemente, resistência à insulina. Ainda, dependendo do grau e cronicidade de estresse de RE, a morte celular por apoptose pode ser ativada (Szegezdi *et al.*, 2009; Mandl *et. al.*, 2009).

Além disso, a ativação hipotalâmica de uma das isoformas das proteínas cinases C (PKC), a PKC-*theta* em resposta a um ácido graxo saturado, o ácido palmítico, é capaz de fosforilar em serina o IRS1, levando a resistência à insulina (Benoit *et al.*, 2009). As PKCs são uma família de proteínas com atividade serina treonina cinase envolvidas em diversas cascatas de sinalização celular (Chand *et al.*, 2012). A PKC- θ tem o papel central de regular a atividade de células T (Marstrand, Kopf, 2008) e atua também na ativação de fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória e na apoptose, como o NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1) (Chand *et al.*, 2012).

O consumo de dieta hiperlipídica causa aumento de PTP1B em roedores (White *et al.*, 2009). Em contrapartida, a redução dessa proteína leva à maior sensibilidade a insulina e leptina hipotalâmica (Picardi *et al.*, 2008). Além disso, a deleção de PTP1B em neurônios POMC leva à hipersensibilização à leptina, gerando anorexia e perda de peso em camundongos (De Jonghe *et al.* 2011). Essa proteína é capaz de atuar na via da leptina desfosforilando a proteína Janus Quinase-2 (JAK2), que é uma proteína cinase associada ao ObR. Quando desfosforilada, a JAK2 interrompe a sinalização da via da leptina. Além disso, a PTP1B também é capaz de desfosforilar proteínas da via de sinalização da insulina, como o próprio IR, gerando assim, inibição da sinalização dessa via (Galic *et al.*, 2005).

Por fim, outra proteína com papel importante na fisiopatologia da obesidade é a SOCS3. Essa proteína é capaz de diminuir a ação da insulina e da leptina (Howard, Flier, 2006) por ligar-se aos receptores ou suas proteínas sinalizadoras, inibindo-as ou facilitando sua degradação. Em hipotálamo de camundongos com obesidade induzida

por dieta hiperlipídica, há ativação anômala dessa proteína, o que contribui para a resistência a esses hormônios (Münzberg *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm mostrado o envolvimento de autofagia, um sistema de degradação celular, com doenças metabólicas e indução de estresse de retículo endoplasmático. (Hotamisligil, 2010; Meng, Cai, 2012).

1.4 Autofagia: definição, regulação e mecanismos

As células de mamíferos possuem dois mecanismos para renovação de seu conteúdo proteico: o sistema ubiquina-proteassoma e a autofagia (Ciechanover, 2012; Nedelsky *et al.*, 2008). O processo de renovação de proteínas intracelulares é essencial para a degradação de proteínas disfuncionais e também, em ocasiões na qual há oferta diminuída de nutrientes, fornecem aminoácidos para a síntese proteica e geração de energia. Conseqüentemente, o acúmulo de proteínas disfuncionais relacionado à falha na regulação e atividade desses processos, tem como resultado a formação de agregados proteicos e aparecimento de diversas doenças como, no caso do sistema nervoso central, de doenças neurodegenerativas (Nedelsky *et al.*, 2008).

A autofagia é dividida em três tipos: a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (CMA). Na microautofagia a superfície do lisossomo sofre uma invaginação e engolfa o material citosólico a ser degradado. Na CMA, uma chaperona citosólica encaminha proteínas específicas para a proteína associada à membrana no lisossomo 2A (Lamp-2A), que transloca o material para o interior do lisossomo onde ocorre a degradação. Já na macroautofagia é formada uma vesícula de dupla-membrana, denominada autofagossomo, que se funde ao lisossomo, formando o autofagolisossomo. No autofagolisossomo proteínas, organelas e lipídeos são degradados pelas enzimas lisossomais (Ravikumar *et al.*, 2010; Glick *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2009).

No que se diz respeito à macroautofagia, denominada daqui por diante de autofagia apenas, a principal via regulatória é a via da *mammalian target of rapamycin* (mTOR). O complexo 1 da mTOR (mTORC1) é o responsável direto por regular

inversamente a via da autofagia. De forma que, sinais como fatores de crescimento, aminoácidos, glicose e sinais de estresse celular ativam esse complexo. A atividade do mTORC1 pode ser inibida pela rapamicina, uma droga isolada de *Streptomyces hygroscopicus* (Ravikumar *et al.*, 2010).

A ULK1 é proteína ortóloga à Atg1 presente em fungos, consiste em uma serina treonina cinase que se complexa com mAtg13, FIP200 e Atg101 (Wirth *et al.*, 2013). Quando há indução de mTORC1 a autofagia é inibida pela interação desse complexo e fosforilação em serina da ULK1 e Atg13. A fosforilação dessas proteínas promove a inibição da atividade cinase desse complexo crucial para o início da autofagia (Ravikumar *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2013). No caso contrário, quando há deficiência de nutrientes, ocorre a inativação de mTORC1 e desfosforilação de ULK1 e de Atg13. Com isso, a ULK1 e suas proteínas associadas dissociam-se da mTORC1 e ocorre autofosforilação de ULK1 que fosforila também FIP200 e Atg13 (Wirth *et al.*, 2013).

A proteína cinase ativada por AMP (AMPK) também atua na atividade da ULK1. A AMPK fosforila e ativa a ULK1, além de inibir a atividade de mTORC1 por fosforilar uma proteína reguladora desse complexo, a proteína da esclerose tuberosa TSC2 (Wirth *et al.*, 2013). Os exatos mecanismos pelos quais a ULK1 regula a indução de autofagia ainda não foram completamente elucidados, porém, a forma ativa dessa proteína parece interagir com diversas proteínas da via da autofagia além de servir como uma reguladora negativa da mTORC1 (Wirth *et al.*, 2013). Uma interação importante dessa proteína é sua capacidade em fosforilar a Beclin-1 em serina, o que permite a ativação do complexo entre a Beclin-1 e VPS34 (Russel *et al.*, 2013).

O processo de autofagia se inicia com a formação de uma membrana de isolamento, ou fagóforo que, em mamíferos, possui origem controversa. Essa membrana, a medida que se expande, capta o substrato a ser degradado até formar o autofagossomo. Então, essa estrutura se funde ao lisossomo, período no qual ocorre a degradação do material contido (Yang, Klionsky, 2009; Glick *et al.*, 2010; Ravikumar *et al.*, 2010). Nesses eventos, alguns processos de sinalização são cruciais.

O complexo entre a Beclin-1 e VPS34 é essencial para a formação da

membrana de isolamento. A Beclin-1 é a proteína ortóloga ao Atg6 em fungos e interage com diversos cofatores responsáveis pela sua ativação ou inativação. Entre as proteínas que estimulam a Beclin-1 estão Atg14L, UVRAG, Bif-1, Rubicon e Ambra1. A interação da Beclin-1 com essas proteínas promove a formação do complexo da Beclin-1 com a Vps34. Em contrapartida, a Beclin-1 possui um domínio BH3 responsável por sua interação com proteínas da via da apoptose, como a Bcl-2 e Bcl-XL, que inibem sua atividade. Quando a Bcl-2 ou a própria Beclin-1 são fosforiladas ocorre a dissociação da ligação. Além disso, a ubiquitinação da Beclin-1 também inibe essa associação. De forma interessante, a clivagem da Beclin-1 pelas caspases é uma conexão entre a via da autofagia e de apoptose (Kang *et al.*, 2011).

Em resposta ao jejum, a JNK1 fosforila a Bcl-2 em serina e treonina, permitindo a liberação da Beclin-1 e consequente associação com a Vps34 e indução de autofagia. Mas além de modificações por fosforilações, a regulação desse complexo pode ocorrer por outras modificações pós-traducionais como por exemplo a ubiquitinação. A Beclin-1 pode ser ubiquitinada em resíduos de lisina 63 (Lys63) pela ação do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), uma enzima ubiquitina ligase (E3) e com isso ela se desliga da Bcl-2 (Wirth *et al.*, 2013). Por outro lado, a deubiquitinação da Beclin-1 pela A20 também regula a ação da Beclin-1, sendo que, com a deubiquitinação em Lys63 ocorre diminuição da indução de autofagia (Shi, Kehrl, 2010).

A Vps34 é uma fosfatidilinositol 3 cinase de classe III, portanto, sua atividade produz fosfatidilinositol trifosfato (PI(3)P) a partir de fosfatidilinositol (PI), fato que é essencial para o recrutamento de proteínas relacionadas à autofagia, conhecidas como Atgs, para a membrana do fagóforo em ascensão (Glick *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2013). A interação de Beclin-1 com Vps34 aumenta a atividade cinase de Vps34 (Glick *et al.*, 2010).

Uma terceira proteína também faz parte do complexo Beclin-1 com Vps34, a p150. Essa proteína permite que o complexo permaneça ancorado à membranas celulares (Wirth *et al.*, 2013).

Posteriormente, sistemas de conjugação semelhantes a ubiquitinação atuam na formação do autofagossomo. Primeiramente, a proteína Atg7 age como uma ubiquitina ativadora *E1 like* ativando a proteína Atg12, que é então transferida para a Atg10, uma ubiquitina *E2 like* que conjuga Atg12 e Atg5. Formado o complexo Atg12-Atg5, ocorre a sua interação com dímeros de Atg16L formando um complexo multimérico. Tal complexo se associa com a membrana de isolamento e induz expansão da membrana (Glick *et al.*, 2010). Além disso, é responsável por recrutar a maquinaria de conjugação da LC3 (Wirth *et al.*, 2013).

O segundo sistema de conjugação semelhante a ubiquitinação é o processamento da *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 B* (LC3B). A LC3 é traduzida como pro-LC3 e está presente no citosol da célula. Quando ocorre indução de autofagia essa proteína é clivada pela Atg4, gerando assim LC3-I. Com a clivagem, o carboxiterminal glicina é exposto e a Atg7 age como *E1 like*, ativando-a. A LC3-I é então transferida para Atg3, uma *E2 like*, nesse momento ocorre a conjugação do terminal glicina a um fosfatidiletanolamina, gerando a forma processada da LC3-I, a LC3-II, que passa a integrar a membrana interna e externa do autofagossomo. A LC3-II é essencial na seleção do substrato a ser degradado pela autofagia (Glick *et al.*, 2010). Essa proteína possui um domínio de interação, denominado região de interação da LC3 (LIR) que interage e recruta outras proteínas para a membrana do autofagossomo (Wirth *et al.*, 2013).

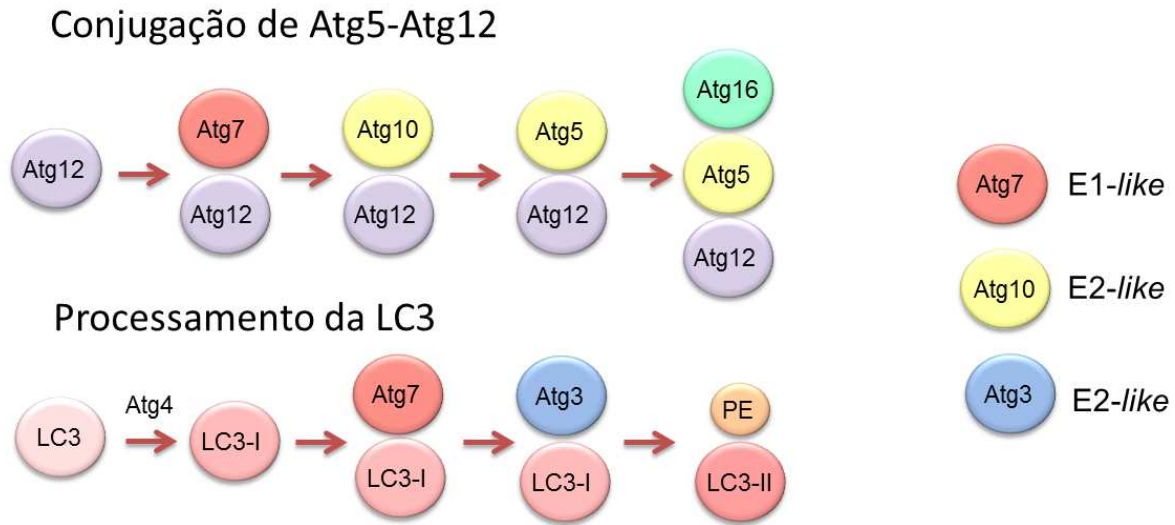


Figura 1. Sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina.

A proteína p62 é capaz de interagir com a LC3, pois possui o domínio LIR. Sendo assim, é incorporada ao autofagossomo e degradada pela autofagia. Além disso, a p62 possui um domínio associado à ubiquitinas (UBA), responsável por sua interação com proteínas ubiquitinas. Com isso, a p62 é uma importante conexão na degradação de agregados ubiquitinados pela autofagia (Komatsu, 2012). De forma interessante, essa proteína pode ativar mTORC1 e assim inibir a autofagia. Assim, a indução de autofagia pelo jejum resulta na degradação de p62 e inibição de mTORC1 (Komatsu, 2012, Pankiv *et al.*, 2007).

1.4 Autofagia: importância para o sistema nervoso central

No sistema nervoso central (SNC), a alteração no processo de autofagia está relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo esse um mecanismo importante na homeostase neuronal e no controle de qualidade proteica (Hara *et al.*, 2006, Wong, Cuervo, 2010). Ainda, a autofagia está intimamente relacionada com o sistema imune e a inflamação (LEVINE *et al.*, 2011). Sinais inflamatórios provenientes da microglia levam à neurodegeneração, sendo que, a manutenção adequada do processo de autofagia exerce um papel neuroprotetor (Alirezai *et al.*, 2008).

Sendo assim, alteração no processo de autofagia pode estar relacionada com a inflamação associada à diabetes e à obesidade. Acredita-se que, a indução da autofagia na presença de estresse de RE seja um mecanismo de *feedback* negativo, limitando o estresse de RE (LEVINE *et al.*, 2011). Nesse contexto, um importante estudo realizado por Yang *et al* (2010) evidenciou que a supressão hepática do gene Atg7 em camundongos resulta em aumento do estresse de RE e resistência à insulina nesses animais.

Recentemente, estudos em roedores demonstraram o papel essencial da autofagia na manutenção da funcionalidade de neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico (Coupé *et al.*, 2012; Kaushik *et al.*, 2011, Quan *et al.*, 2012; Meng, Cai, 2011).

Sabendo que a obesidade é caracterizada por uma inflamação subclínica, que leva à resistência à insulina e à leptina hipotalâmica e que essa inflamação está relacionada com alteração na homeostase celular e ativação de vias de estresse celular, a falha na regulação da autofagia em hipotálamo de camundongos obesos pode representar um novo e importante mecanismo na patogênese da obesidade.

2 Objetivos

2.1 Geral

- Caracterizar a autofagia em hipotálamo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica

2.2 Específicos

- Avaliar a modulação de proteínas da via da autofagia em hipotálamo de camundongos *Swiss* com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Verificar o efeito da indução hipotalâmica de autofagia em parâmetros metabólicos e também na modulação de estresse de retículo endoplasmático, inflamação e apoptose em hipotálamo de animais obesos;
- Avaliar a modulação de proteínas marcadoras de autofagia em hipotálamo de camundongos *swiss* tratados intracerebroventricularmente com ácido graxo saturado (ácido esteárico);

3 Capítulo I

Artigo científico

The Journal of Nutrition NUTRITION/2013/182972 Version 1

THE JOURNAL OF NUTRITION
Official Publication of the American Society for Nutrition

Autophagy induction ameliorates hypothalamic inflammation and glucose sensibility in high-fat diet induced obese mice^{1,2,3}

Mariana Portovedo⁴, Letícia Ignácio-Souza⁷, Bruna Bombassaro⁵, Andressa Coope⁵, Andressa Reginato⁴, Daniela S Razolli⁵, Marcio A Torsoni⁴, Adriana S torsoni⁴, Raquel R Leal⁶, Lício A Velloso⁵, Marciane Milanski⁴

⁴*Faculdade de Ciências Aplicadas,* ⁵*Laboratório de Sinalização Celular and*
⁶*Departamento de Cirurgia – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, SP;*
⁷*Faculdade de Nutrição, Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT – Brasil*

¹ This project has been funded by grants 2011/14565-4 (Portovedo M) and RA2011/51205-6 (Milanski M), São Paulo Research Foundation (FAPESP).

² Author disclosure: M. Portovedo, L.M. Ignacio-Souza, B. Bombassaro, A. Coope, A. Reginato, D.S. Razolli, M.A. Torsoni, A.S. Torsoni; R.F. Leal, L.A. Velloso and M. Milanski have no conflicts of interest.

³ Supplemental Figures 1-2 and additional methods are available as Online Supporting Material with the online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>.

⁸ Abbreviations used: DIO (diet-induced obesity), HFD (high-fat diet), icv (intracerebroventricular), LC3B (microtubule-associated protein light chain 3 B),

* Correspondence should be addressed to: Marciane Milanski – Laboratório de Distúrbios do Metabolismo, Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas, 13484-350, Limeira SP – Brazil. Telephone number: +5519 37016705

Email: marciane.milanski@fca.unicamp.br.

Abstract

Autophagy is an important process which regulates cellular homeostasis by degrading dysfunctional proteins, organelles and lipids. Recent data have shown that absence of autophagy in hypothalamic POMC neurons of mice results in glucose intolerance and weight gain. Here we evaluated the hypothalamic distribution and content of autophagy's machinery proteins in an animal model of diet-induced obesity at 8 and 16 weeks of diet and in response to intracerebroventricular injections of a saturated fatty acid. We demonstrated that chronic exposure to a high-fat diet can lead to an increased expression of inflammatory markers and loss of basal autophagy. Intracerebroventricular treatment with stearic acid appears to contribute to the decrease of the autophagy machinery. Although we have not observed weight loss during treatment with the drug inducing autophagy in diet-induced obese mice, we observed improved glucose tolerance and reverse inflammatory and apoptosis markers, the main mechanism involving dysregulation of energy balance related to hypothalamic neurons. Understanding the cellular and molecular bases of these processes is crucial for identifying new diagnostic and therapeutic targets for obesity.

Introduction

Obesity is the result of a disproportionately high energy intake compared to energy expenditure that is triggered by a complex interaction between environmental and genetic factors (1-3). Excess of calories and diet composition, particularly the presence of long-chain saturated fatty acids, results in metabolic dysfunction and increased body weight (4).

Hypothalamus is the main center controlling energy intake and expenditure. In a model of diet induced obesity (DIO), the chronic intake of high fat diet (HFD) is shown to negatively impact hypothalamic neurons causing leptin and insulin resistance. This phenomenon plays a critical role on the development of hyperphagia and obesity (3, 5, 6). Under overnutrition, leptin and insulin resistance are at least in part mediated by increased inflammatory markers in hypothalamic neurons such as TNF- α e IL-1 β and the activation of JNK and IKK-NF κ B pathway (3,5-7).

The induction of hypothalamic inflammatory pathways in response to DIO involves the activation of TLR2/4 (4) and endoplasmic reticulum stress induction (4,8). Additionally, chronic inflammatory stimuli can lead to apoptosis of neurons important for the anorexigenic response (9,10). Furthermore, two recent neuroimaging studies revealed that dysfunction activity and neuronal loss associated with obesity in the hypothalamus of humans (11, 12).

In addition to the effects on food intake and energy expenditure, hypothalamic inflammation seems to impair systemic glucose metabolism. Indeed, both the genetic and pharmacological approaches used to modulate endoplasmic reticulum stress and

inflammation pathways in the hypothalamus were able to affect liver gluconeogenesis (13-15). Inhibition of either TLR4 or TNF α signaling in the hypothalamus improves insulin signal transduction in the liver and reduces hepatic glucose production (4). These data suggest that hypothalamic inflammation plays a broad role on weight gain and dysfunction of systemic glycemic control.

Recent findings show that neuronal autophagy is compromised in situation of fatty acids excess from the diet (16). Here, we explore the hypothesis that malfunction of the macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) system could contribute to the deterioration of hypothalamic neuronal function related to the regulation of body energy homeostasis in a time-dependent way. Autophagy is a homeostatic process responsible for the degradation of damaged proteins and organelles that takes place in all eukaryotic cells and involves the sequestration of cytoplasmic components in double-membraned autophagosomes (17). These structures subsequently fuse with lysosomes, where their cargoes are delivered for degradation and recycling (17-19). Impaired autophagy may lead to progression of inflammation, for example, suggesting that autophagy contributes to the inhibition of inflammatory responses (16, 20, 21).

We show that mice under chronic exposure to high-fat diet shows increased expression of inflammatory markers that is paralleled by loss of basal autophagy. Also, intracerebroventricular (icv) treatment with saturated fatty acid appears to contribute to decreased efficiency of autophagy in hypothalamus.

Activation of autophagy in hypothalamus by icv injection of rapamycin improved glucose tolerance in obese animals without an effect in body weight. Importantly, this

intervention decreased cellular stress in hypothalamus of obese animals. Understanding the cellular and molecular bases of this process is crucial for identifying new diagnostic and therapeutic targets for obesity.

Materials and Methods

Experimental animals

Male Swiss mice were provided by University of Campinas Animal Breeding Center (CEMIB, Brazil) with 7 weeks of age. Experiments followed the Guide for the care and use of laboratory animals published by National Institute of Health (22) and the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the ethics committee at the State University of Campinas (protocol 2623-1). Animals were maintained on a 12 hour light-dark cycle and kept in individual cages with *ad libitum* food and water. In some experiments, mice received either chow diet (71%kcal carbohydrate, 20%kcal protein, 9%kcal lipids) or high-fat diet (26%kcal carbohydrate, 15%kcal protein, 59%kcal lipids) for 8 or 16 weeks. To evaluate the effect of a saturated fatty acid alone, mice were submitted to a stereotaxic surgery and were treated intracerebroventricularly.

Cannula implant and fatty acid administration

Mice were submitted to an extereotaxic surgery in which a cannula was placed on lateral ventricle (anteroposterior 0.34 mm, lateral 1.0 mm and depth 2.2 mm) according to a previously described method (23). After 7 days of recovery, water drinking response after administration of 2 μ l of 10^{-6} M angiotensin II (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to confirm the position of the cannula. After two days mice were treated with 2 μ l of a

solution containing 180, 270 or 360 μM of stearic acid (Sigma). Fatty acid was diluted to final concentrations and conjugated with bovine serum albumin free of fatty acids. Mice were treated with 2 μl of the solution for 5 days.

Protein extraction and Immunoblotting

Anesthetized mice were decapitated and the hypothalamus was excised. Tissues were homogenized with a tissue homogenizer (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) with a Triton X-100 buffer plus anti-protease cocktail. Protein concentration was determined by dye-binding protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). To perform immunoblotting, 30 μg of the protein extract of each sample were incubated for 5 minutes at 95°C with Laemmli buffer (1 mmol sodium phosphate/L, pH 7.8, 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% SDS, 2% mercaptoethanol). Thereafter, samples were separated by SDS-PAGE in polyacrylamide gels and then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) in a Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) for 30min at 20V in a buffer containing methanol and SDS. Membranes were blocked with a solution containing 5% of skimmed milk in TTBS (10 mmol Tris/L, 150 mmol NaCl/L, 0.5% Tween 20) for at least 2 hours at room temperature. Then, the membranes were incubated overnight with primary antibodies described in supplemental material at 4°C. The membranes were then incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour at room temperature. Bands were detected by chemiluminescence (Thermo Scientific #34078) and quantified by densitometry (UN-Scan-it Gel 6.1, Silk Scientific Inc, Orem, Utah USA).

Immunofluorescence staining

SNC of mice was fixed in 4% paraformaldehyde and hypothalamus was processed for embedding in paraffin block. After sectioning in 5.0 μm , samples were incubated with primary antibodies overnight and after with second antibodies conjugated to FITC or rhodamine for 2 hours (sc2777; sc2092, respectively - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). DAPI was used for nuclear staining. Leica FW 4500 B microscope was used for image capturing. Hypothalamic areas were observed according to the landmarks of the mouse brain atlas (24). Analysis and documentation of results were performed using a Leica Application Suite V3.6 (Switzerland).

RNA extraction and qRT-PCR

Hypothalamic tissue was homogenized in Trizol (Invitrogen 15596018, Sao Paulo, Brazil) and RNA was isolated and quantified (Nanodrop 8000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Integrity of RNA was assessed by agarose gel. cDNA was synthesized with 3 μg of total RNA sample with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 4368813). qRT-PCR analysis was performed in an ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). GAPDH primer was used as control. Each PCR contained 3.0 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nM of each primer, TaqManTM (Applied Biosystems) and RNase free water. Data was analyzed with 7500 System SDS Software (Applied Biosystems – Life Technologies).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean values \pm SEM. Levene's test for the homogeneity of

variances was initially used to check if the data could be used for parametric analysis of variance. Unpaired Student's t-test was used to compare differences between two groups. When there were more than two groups One-Way ANOVA was performed. Two-Way ANOVA was applied when necessary. Tukey Post Test was used when needed. In all cases $p < 0,05$ was considered as statistically significant. Data was analyzed with software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA).

Results

Evaluation of metabolic parameters of Swiss mice fed on a high fat diet.

Swiss mice fed on HFD exhibit higher body mass compared to mice fed on control diet (Chow), from 8 weeks on HFD until 16 weeks (Figure 1A). At 16 weeks on HFD obese mice presented increased mRNA levels of inflammatory markers such as, IL-1 β (Figure 1B) and TNFR1 (Figure 1C) when compared with chow group. On contrary, mRNA levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine was decreased in obese animals. (Figure 1E).

Autophagy marker LC3 is abundantly expressed in the arcuate nucleus

Autophagy is an important cellular process for degrading proteins and recycling of organelles and pathogens. Alterations in autophagy flux have been show to contribute to defects in insulin signaling and ER stress in obesity in peripheral tissues. In order to investigate if the regulation of autophagy plays a role in hypothalamic cellular homeostasis, we first evaluated the presence of the autophagy markers in hypothalamic neurons such as LC3B (microtubule-associated protein light chain 3 B), an indicator of

autophagosome formation, and ATG7, an activating protein ubiquitin-like E1 involved in initial autophagosome formation. As depicted in Figure 2A, LC3B (I and II) is expressed in the mediobasal hypothalamus of animals treated with both diets at 8 (figure 2A) and 16 (figure 2B) weeks. Also, LC3 expression colocalizes with neurons and microglia from hypothalamic arcuate nucleus (Supplemental Figure 1A and B). Moreover, LC3 colocalizes with Lamp-1, a lysosome marker, in hypothalamus of mice (Supplemental Figure 2A). ATG7 is also expressed in the hypothalamic arcuate nucleus of lean and obese mice (Supplemental Figure 2B).

Modulation of hypothalamic autophagy in mice chronically exposed to a high saturated fat diet

In order to investigate if autophagy is regulated under obesity condition; we fed Swiss mice with chow or HFD for 16 weeks. After 8 weeks on HFD, no difference in protein content of LC3-II in the hypothalamus was observed (Figure 3A). However, at this time point we observed an increased content of p62 (figure 3B). This results show that after 8 weeks on HFD, autophagy's machinery is partially preserved. On the other hand, when mice were exposed more chronically to a HFD (16 weeks), the protein content of hypothalamic LC3-II was lower (figure 3C) and p62 was higher (Figure 3D) when compared to lean mice. Also, *Ulk1* gene expression was upregulated in obese animals (Figure 4D), as well as *Becn1*, and *Sqstm1* gene expression (Figure 4B and E). Nevertheless, no difference was found in *MAPLLC3*, the LC3 gene (Figure 4D) compared to Chow group. These data demonstrated that the impairment of

hypothalamic autophagy under chronic HFD feeding leads to loss of autophagy probably causing accumulation of aggregated proteins and loss of cellular homeostasis.

Hypothalamic modulation of autophagy by isolated saturated fat acid

Next, we evaluated the effects of long-chain saturated fatty acids on autophagy, since they are known by its inflammatory properties in hypothalamus (4). As depicted in Figure 5, there was a gradual increase in p62 content in response to *icv* treatment with different doses of stearic acid.

Increased hypothalamic autophagy by Rapamycin counteracts the effects of HFD in mice.

Once we observed a defect in autophagy in animals with chronic exposure to HFD, we asked whether the activation of hypothalamic autophagy could reverse the deleterious effects of obesity. To test this hypothesis, obese animals were treated *icv* with rapamycin, an mTOR inhibition drug known to induce autophagy. As shown in figure 6 A, no differences were observed in a glucose tolerance test, after 30 minutes of glucose injection between obese mice treated with rapamycin when compared to obese mice treated with saline. Also, obese mice treated with saline had higher glucose levels at this point when compared to lean mice with the same treatment. Nevertheless, obese mice treated with rapamycin did not show any difference in total area under the curve of glucose, the only difference observed was in obese saline treated mice compared to lean saline treated mice (figure 6B). There were no differences in food intake and body mass between treated and untreated animals (figure 6C and D). Although no differences were found in systemic glucose metabolism and food intake after rapamycin treatment

this intervention was able to increase hypothalamic content of LC3-II (Figure 7A) and decreased p62 (Figure 7B). Moreover, rapamycin was able to reduce phosphorylation of JNK1, an inflammatory marker (Figure 8A) and reduce EIF2 α phosphorylation, a marker of ER stress (Figure 8B). Also, there was a reduction in the content of proapoptotic protein Bax (Figure 8C) and increased content of antiapoptotic protein Bcl-2 (Figure 8D), showing the protective effect of autophagy in the restoration of cellular homeostasis in hypothalamus of HFD fed animals for 16 weeks.

Discussion

Unlike inflammation in peripheral tissues, which develops as a consequence of obesity, hypothalamic inflammatory signaling is evident in the first days of was evident in both rats and mice within 1 to 3 days of HFD onset, prior to substantial weight gain, indicating that the diet rather than increased adiposity is the cause of insulin insensitivity and inflammation (12).

In this work we hypothesized that chronic exposition to a high-saturated fat diet could modulate autophagy in hypothalamus of mice. It is known that autophagy is the main route to degradation and recycling of damaged organelles and long-lived proteins and its role in CNS has been demonstrated in a number of neurodegenerative diseases (25-28).

We demonstrated that LC3B and Atg7 are present in the hypothalamic arcuate nucleus in both lean and obese mice in microglia and neurons cells. An interesting perspective is that hypothalamic modulation of autophagy in response to obesity could be nucleus or cell specific. Recent studies have shown the importance of basal levels of

autophagy in maintaining the functionality of hypothalamic neurons. When autophagy is inhibited specifically in AgRP neurons, the physiological increase in the expression of this neurotransmitter in response to fasting is abolished, leading to increased POMC and α -MSH and generates a lean phenotype in mice (29). In contrast, deletion of Atg7 in POMC neurons leads to protein aggregates formation due to the accumulation of p62 (30). P62 is a multifunctional adapter protein that recruits ubiquitinated proteins to the autophagosome (31,32) and its increase is a sign defective autophagy in the cell (33). Lack of autophagy efficiency in POMC neurons also resulted in higher food intake caused, at least in part, by leptin resistance and decreased energy expenditure and, as a consequence, these animals exhibit increased body mass (30). Another group showed accumulation of aggregated proteins marked with ubiquitin and p62, decreased axonal projection of POMC neurons and the same phenotype in response to POMC-specific deletion of Atg7 (34).

Although the quantification of autophagy is difficult, since this mechanism is a dynamic process involving formation and processing of protein biomarkers such as LC3-II, we observed reduction in this autophagy marker in response to chronic exposure to HFD (16 weeks) but not with 8 weeks of HFD. This data suggests lost in efficiency of autophagy machinery over the exposure to obesity. An important aspect observed both in animals and in humans is the time of exposure to obesogenic environment: the longer the time in which the individual remains obese, the more difficult restore metabolic homeostasis (35,36). It is believed that one of the causes for the loss of control of food intake in chronic obesity would be the loss of hypothalamic neurons involved in the regulation of energy homeostasis (9, 37).

Autophagy and apoptosis have many features in common and the regulation of both mechanisms is crucial to decide if a cell would survive or not in response to cellular stress (38). Most of the times, autophagy protects neurons from death in stress situations (39-41), although autophagy can be a type of programmed cell death (42). Because of this, our finding raises an interesting mechanism that could contribute to apoptosis of hypothalamic neurons in chronic exposure to HFD. In this context, hypothalamic autophagy defect in obese mice can exacerbate IKK β /NF- κ B activation and potentiate inflammation present in DIO (16).

We have found that genes involved in the initial steps of autophagy induction are upregulated in mice treated 16 weeks with HFD. We propose that posttranslational events could be involved in regulation of autophagy in obesity or autophagy is disrupted at a latter point such as Atg5-12 conjugation, LC3 processing or autophagosome/lysosome fusion. Although the exact mechanism by which there was a downregulation of autophagy in our model is unknown, another possibility is that inflammatory mediators produced primarily by microglia, leads to decreased autophagy activation in neurons (43).

Although autophagy occurs at basal levels in all cells, diverse environmental stressors and nutrient deprivation are strong inducers of this degradative machinery (44). A key negative regulator of autophagy is the nutrient sensor mTOR (45, 46). Because of that, rapamycin, a potent inhibitor of mTOR, is largely used as an autophagy inductor (47).

Our results show that short-time treatment with rapamycin was able to ameliorate

glucose sensibility in obese mice despite no difference in body mass. Also, the drug was able to modulate important markers of autophagy in the hypothalamus, suggesting an improvement of autophagy. A recent study propose that the time of the treatment with rapamycin is crucial to metabolic phenotype, in the first weeks of intraperitoneal treatment the authors found glucose intolerance in mice, but at 20 weeks of treatment, rapamycin was able to ameliorated glucose sensibility (48). For that reason, we conclude that the effect of rapamycin directly in hypothalamus has different effects on glucose sensibility than in peripheral tissues in a short-time treatment.

Also, as expected, icv treatment with rapamycin in obese mice inhibits inflammatory and apoptotic stimuli and reverse induction of ER stress, showing a protective effect of the restoration of autophagy in cellular stress in animals fed HFD. Induction of autophagy contributes to limiting the ER stress (49). An important study by Yang et al (2010) showed that suppression of hepatic gene Atg7 in mice results in increased ER stress and insulin resistance in these animals (50).

We concluded that obesity causes downregulation of hypothalamic autophagy that may contribute to neuronal dysfunction. This can lead to formation of protein aggregates, accumulation of dysfunctional mitochondria, inflammation and ultimately apoptosis. Perturbation in autophagy's homeostasis could be related to apoptosis which is present in hypothalamic neurons of obese mice and is pointed as the cause of the irreversibility of hypothalamic feed control dysregulation in chronic obesity. Reversal of basal autophagy in hypothalamus of obese mice could be an interesting target to control neuronal injury and to improve glucose homeostasis. Understanding the biological basis

of obesity and obesity-related pathologies and discovering medical therapies to restore metabolic function is an urgent need for the biomedical community.

Acknowledgements

M.M. and L.A.V designed the research; M.P., L.M.I.S., A.C., A.R. and D.S.R. conducted the research, M.P., A.S.T. and M.M. analyzed the data, M.P. and M.M. wrote the paper, R.L. and M.A.T. provided essential materials; M.M. had primary responsibility for the final content. All authors have read and approved the final manuscript. We thank D.C.M. for English review and M.C for care of animals.

References

1. Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetic factors in human obesity. *Obes Rev.* 2007; 8:37–40. doi: 10.1111/j.1467-789X.2007.00315.x.
2. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes.* 2008; 3:S109–S119. doi: 10.1038/ijo.2008.246.
3. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes.* 2011; 35:1455–1465. doi: 10.1038/ijo.2011.56
4. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, *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.* 2004; 29(2):359-370. doi:10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009
5. Schwartz MW, Porte Jr D. Diabetes, obesity, and the brain. *Science.* 2005; 21: 307(5708)- 375-9. doi: 10.1126/science.1104344.

6. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci.* 2012; 15(10):1350-5. doi: 10.1038/nn.3217
7. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005; 146(10): 4192-9. doi: 10.1210/en.2004-1520.
8. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 2008; 135(1):61-73. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.043.
9. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *Plos One.* 2009; 4(4):5045. doi:10.1371/journal.pone.0005045.
10. McNay DE, Briançon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest.* 2012; 122(1):142-52. doi:10.1172/JCI43134.
11. van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, Chaim EA, Pareja JC, Geloneze B, Li LM, *et al.* Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes.* 2011; 60(6):1699-704. doi: 10.2337/db10-1614.
12. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012; 122(1):153-62. doi:10.1172/JCI59660.

13. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev.* 2009; 89: 1025–1078. doi: 10.1152/physrev.00011.2008.
14. Kalsbeek A, Bruinstroop E, Yi CX, Klieverik LP, La Fleur SE, Fliers E. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 2010; 1212:114–129. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05800.x
15. Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, Cai D. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 2939–2944. doi: 10.1073/pnas.1006875108.
16. Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase beta (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem.* 2011; 286(37):32324-32. doi: 10.1074/jbc.M111.254417.
17. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010; 90(4):1383-435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009.
18. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 335:1-32. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8_1.
19. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010; 221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.
20. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by

targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 2012; 13(3): 255-63. doi: 10.1038/ni.2215.

21. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschoop J, *et al.* Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem.* 2011; 286(11):9587-97. doi: 10.1074/jbc.M110.202911

22. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Publication no. 85-23 (rev.). National Institutes of Health, Washington, DC; 1985.

23. Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperis GR, Picardi PK, Hirabara S, *et al.* Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem.* 2009; 284: 36213-36222. doi: 10.1074/jbc.M109.030874.

24. Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods.* 1980; 3(2):129-49.

25. Kege KB, Kim M, Saap E, McIntyre C, Castaño JG, Aronin N, Difiglia M. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J. Neurosci.* 2000; 20:7268–7278.

26. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005; 64:113–122.

- 27.** Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(35):23542-56. doi: 10.1074/jbc.M801992200.
- 28.** Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z, Rockenstein E, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ, Unni VK. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein. *J Neurosci.* 2011; 31(41):14508-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011.
- 29.** Kaushik S, Rodriguez-Navarro JA, Arias E, Kiffin R, Sahu S, Schwartz GJ, Cuervo AM, Singh R. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab.* 2011; 14(2):173-83. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.008.
- 30.** Quan W, Kim HK, Moon EY, Kim SS, Choi CS, Komatsu M, Jeong YT, Lee MK, Kim KW, Kim MS, *et al.* Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology.* 2012; 153(4):1817-26. doi: 10.1210/en.2011-1882.
- 31.** Pankiv S, Høyvarde Clausen T, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282:24131-45. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- 32.** Itakura E, Mizushima N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol.* 2011; 192(1):17-27. doi: 10.1083/jcb.201009067.

- 33.** Klionsky DJ, Abeliovich, H, Agostinis, P, Aguirre G, Ahan JA, Ait M, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008; 4(2):151-75.
- 34.** Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, Komatsu M, Horvath TL, Bouret SG. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metab*. 2012; 15(2):247-55. doi: 10.1016/j.cmet.2011.12.016.
- 35.** Guo J & Hall KD. Estimating the continuous-time dynamics of energy and fat metabolism in mice. *Plos Comput Biol*. 2009; 5(9):e1000511. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000511.
- 36.** Kraschnewski JL, Boan J, Esposito J, Sherwood NE, Lehman EB, Kephart DK, Sciamanna CN. Long-term weight loss maintenance in the United States. *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34:1644-1654. doi:10.1038/ijo.2010.94.
- 37.** Li J, Tang Y, Cai D. IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol*. 2012; 14:999-1012. doi: 10.1038/ncb2562.
- 38.** Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2001; 18(4):571-80. doi:10.1038/cdd.2010.191.
- 39.** Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005; 1: 112–119.

- 40.** Zhang X, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, Shen Y, Wang RR, Wang X, Hu WW, Wang G, Chen Z. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy*. 2013; 12:9(9).
- 41.** Pamerter ME, Perkins GA, McGinness AK, Gu XQ, Ellisman MH, Haddad GG. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra. *PLoS One*. 2012; 7(12):e51469. doi: 10.1371/journal.pone.0051469.
- 42.** Baehrecke EH. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ*. 2003; 10(9) 940-5.
- 43.** Alirezaei M, Kiosses WB, Flynn CT, Brady NR, Fox HS. Disruption of Neuronal Autophagy by Infected Microglia Results in Neurodegeneration. *PLoS ONE*. 2008; 3(8):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0002906
- 44.** Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell metabolism*. 2011; 13:495-504. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.004
- 45.** Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004; 279:73-84.
- 46.** Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22:157-168. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.005.
- 47.** Yang YP, Hu LF, Zheng HF, Mao CJ, Hu WD, Xiong KP, Wang F, Liu CF. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(5):625-35. doi: 10.1038/aps.2013.5.

- 48.** Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, Wang F, Javors MA, Chen J, Sun LY, Bartke A. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab.* 2013; 17(3):456-62. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.008.
- 49.** Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011; 20(77330):323-35. Doi: 10.1038-nature09782.
- 50.** Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil, GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010; 11(6):467-78. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.005.

Figure Legends

Figure 1. Weight gain and inflammatory markers in hypothalamus of obese mice. **A** - Weight gain of mice fed high-fat diet versus chow diet until 16 weeks of feeding. **B, C and D** - IL1- β , TNFR1 and IL-10 respectively gene expression by qRT-PCR in hypothalamus of diet-induced obese mice. Values are shown as mean \pm SEM. *P < 0.05. n= 6 animals per group.

Figure 2. LC3 is expressed in arcuate nucleus of Swiss mice. **A** – Immunostaining of LC3 (green) in arcuate hypothalamic nucleus of lean and obese mice (8 weeks of HFD). DAPI staining (blue) reveals nuclei of cells. **B** – Immunostaining of LC3 (green) in arcuate hypothalamic nucleus of lean and obese mice (16 weeks of HFD).

Figure 3. LC3 and p62 content in hypothalamus of diet-induced obese mice with 8 and 16 weeks of diet treatment. **A** – Western-blotting showing LC3-II to β -actin ratio in hypothalamus of obese mice with 8 weeks on HFD. **B** – p62 content in hypothalamus of obese mice with 8 weeks on HFD. **C** - LC3-II to β -actin ratio in hypothalamus of obese mice with 16 weeks on HFD. **D** – p62 content in hypothalamus of obese mice with 18 weeks on HFD. Values are shown as mean \pm SEM. *P < 0.05. n= 4-7 animals per group.

Figure 4. mRNA gene expression of autophagy machinery proteins in hypothalamus of obese mice. **A, B, C, D and E** – Ulk1, Becn1, Atg5, Map1lc3 and Sqstm1 gene expression by qRT-PCR in hypothalamus of diet-induced obese mice (16 weeks on HFD) versus lean mice. Values are shown as mean \pm SEM. *P < 0.05. n= 6 animals per group.

Figure 5. Stearic acid leads to p62 accumulation. **A** –Western blotting of p62 in hypothalamus of obese mice (16 weeks on HFD) treated for 5 days with 2 μ l of a solution containing 180, 270 or 360 μ M of stearic acid or saline (Sal) once a day. Values are shown

as mean \pm SEM. *P < 0.05.n=3-4 animals per group.

Figure 6. Metabolic parameters in mice treated icv with Rapamycin. **A and B**– GTT curve and area under the GTT of lean or obese mice (16 weeks of HFD) treated with 2 μ l of a solution containing 25 μ M rapamycin (Rap) or saline (Sal) once a day for 5 days. **C and D** – Food intake and weight modulation in obese mice treated with rapamycin. Values are shown as mean \pm SEM. *P < 0.05 HFD versus chow diet treated with saline and HFD treated with rapamycin versus HFD treated with saline. n= 5-6 animals per group.

Figure 7. Rapamycin treatment reverses autophagy's downregulation in obese mice. **A** – Western blotting showing LC3-II to β -actin ratio in hypothalamus of diet induced obese mice (16 weeks on HFD) treated for 5 days with 2 μ l of a solution containing 25 μ M rapamycin (Rap) or saline (Sal) once a day for 5 days. **B** – p62 content in hypothalamus of diet induced obese mice treated with rapamycin. Values are shown as mean \pm SEM. *P < 0.05. n=5-6 animals per group.

Figure 8. Rapamycin treatment decreases inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis markers in obese mice. **A and B** –Western blotting of pJNK and pEIF2 α content in hypothalamus of obese mice (16 weeks on HFD) treated for 5 days with 2 μ l of a solution containing 25 μ M rapamycin (Rap) or saline (Sal) once a day for 5 days. **C and D** – Bax and Bcl-2 content in hypothalamus of obese mice treated with rapamycin. Values are shown as mean \pm SEM. *P < 0.05.n=5-6 animals per group.

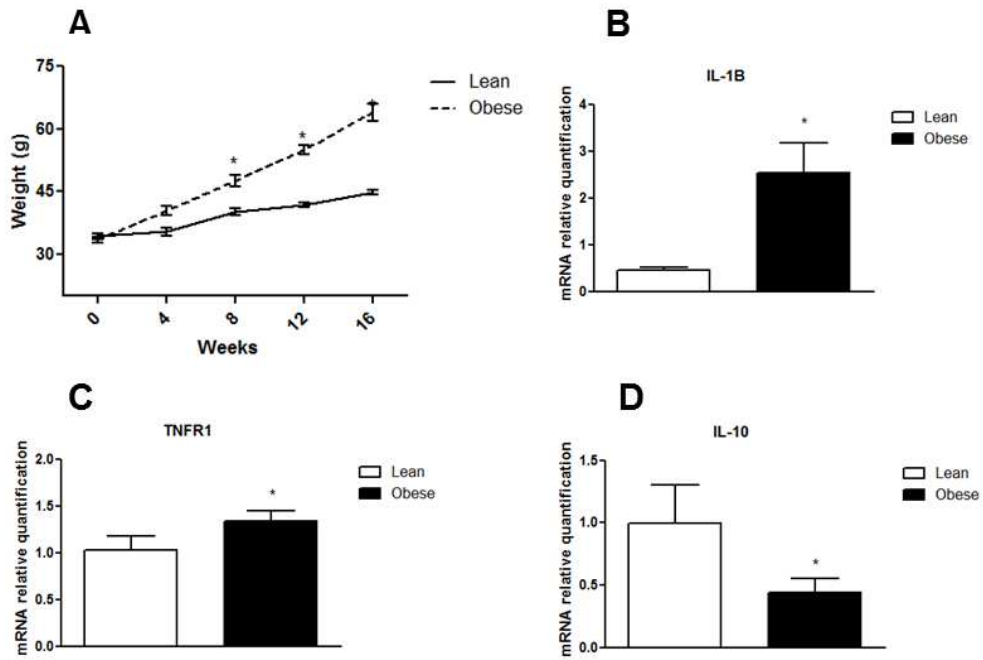


Figure 1. Weight gain and inflammatory markers in hypothalamus of obese mice.

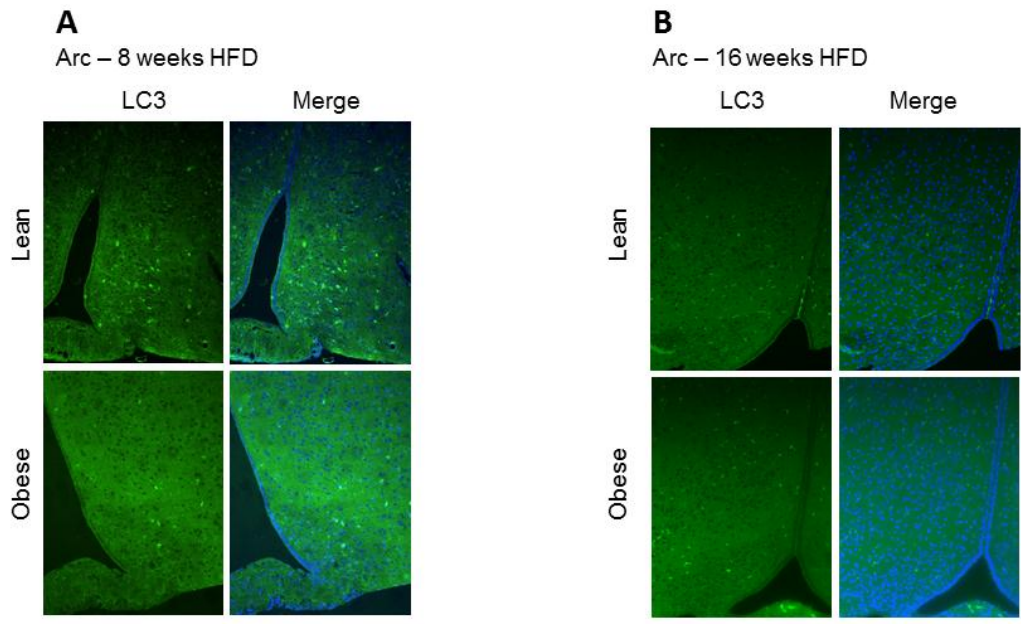


Figure 2. LC3 is expressed in arcuate nucleus of Swiss mice and colocalizes with hypothalamic neurons and microglia cells.

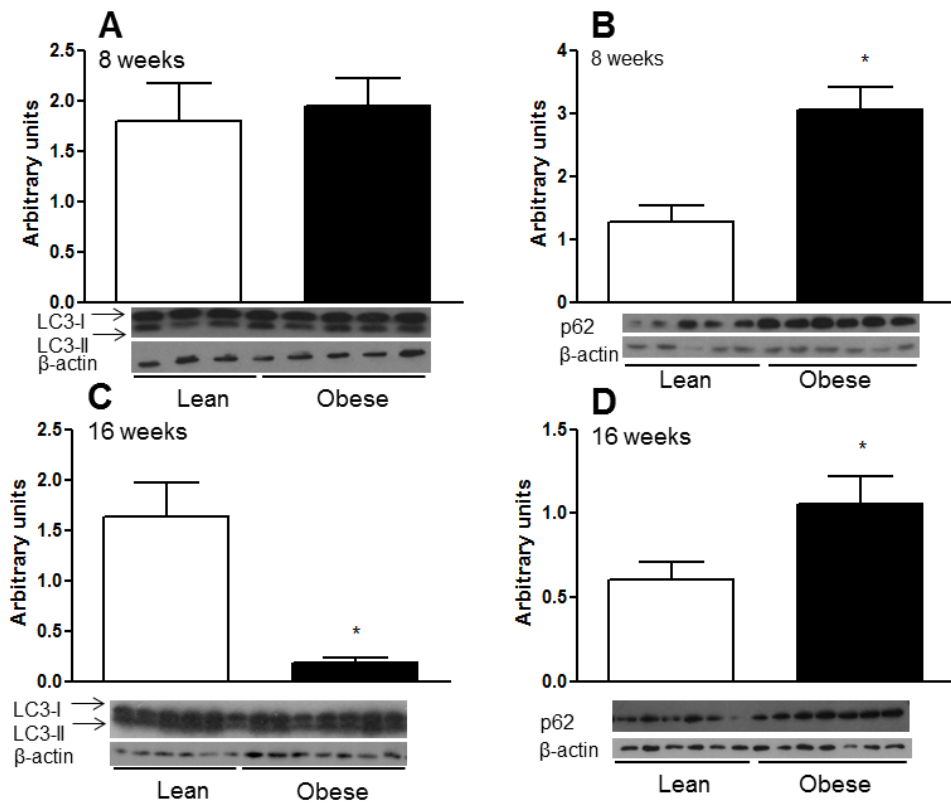


Figure 3. LC3 and p62 content in hypothalamus of diet-induced obese mice with 8 and 16 weeks of diet treatment.

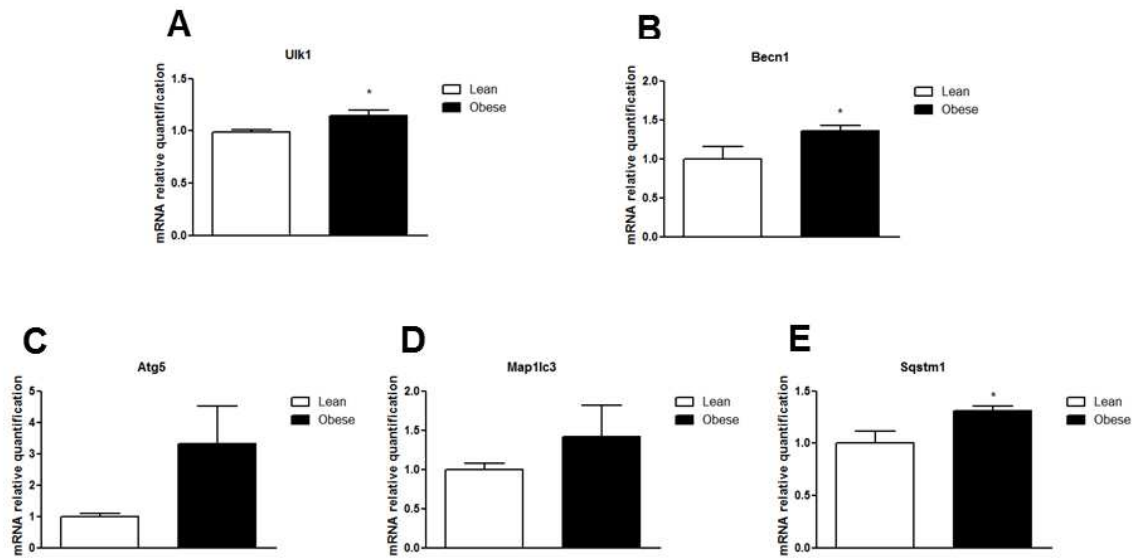


Figure 4. mRNA gene expression of autophagy machinery proteins in hypothalamus of obese mice.

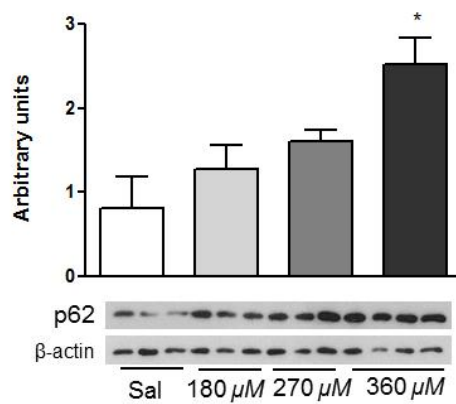


Figure 5. Stearic acid leads to p62 accumulation.

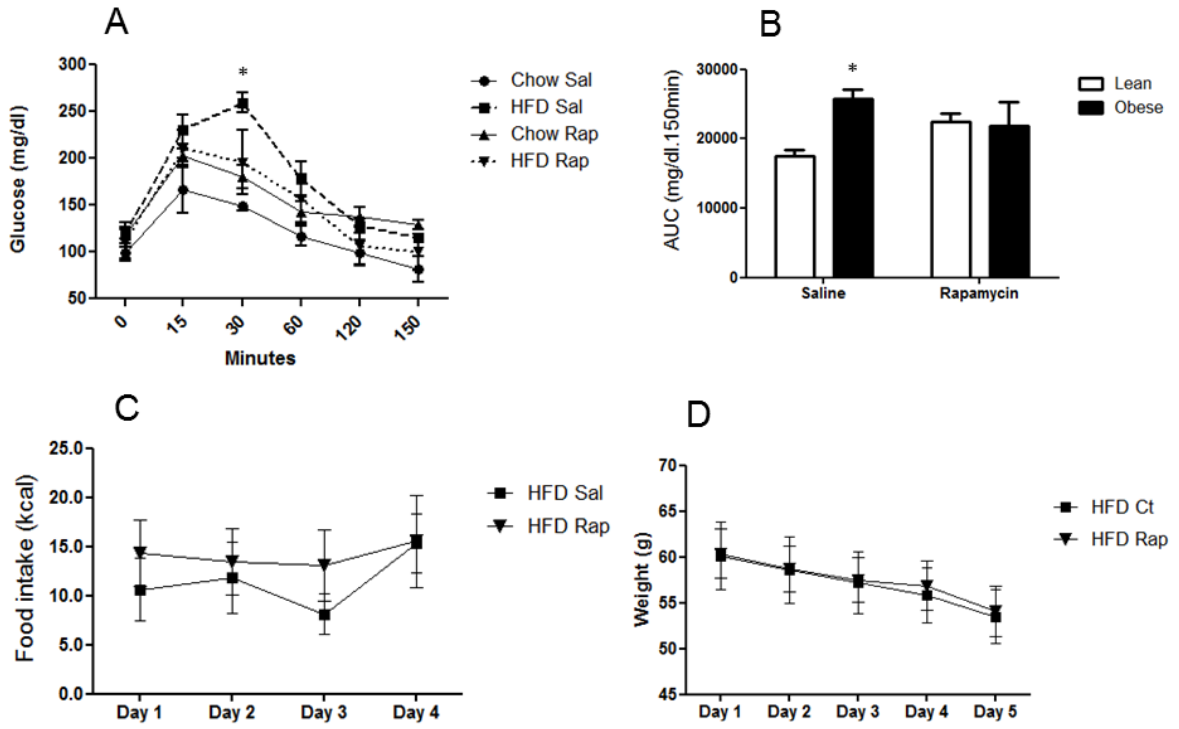


Figure 6. Metabolic parameters in mice treated icv with Rapamycin.

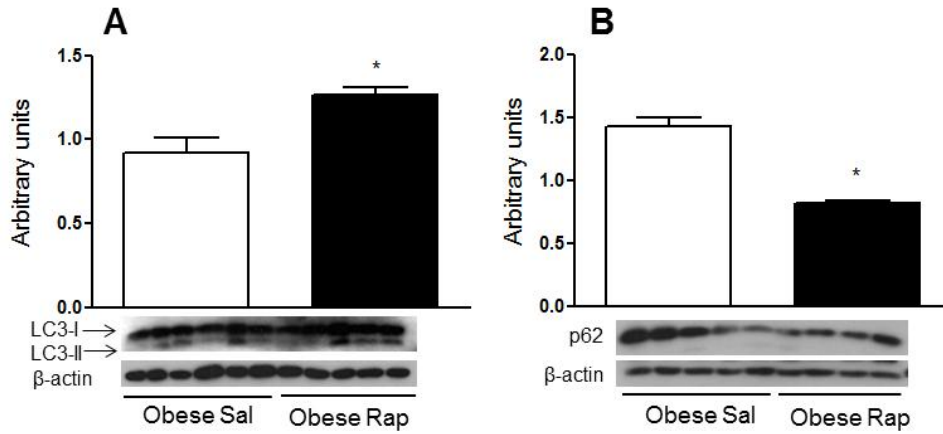


Figure 7. Rapamycin treatment reverses autophagy's downregulation in obese mice.

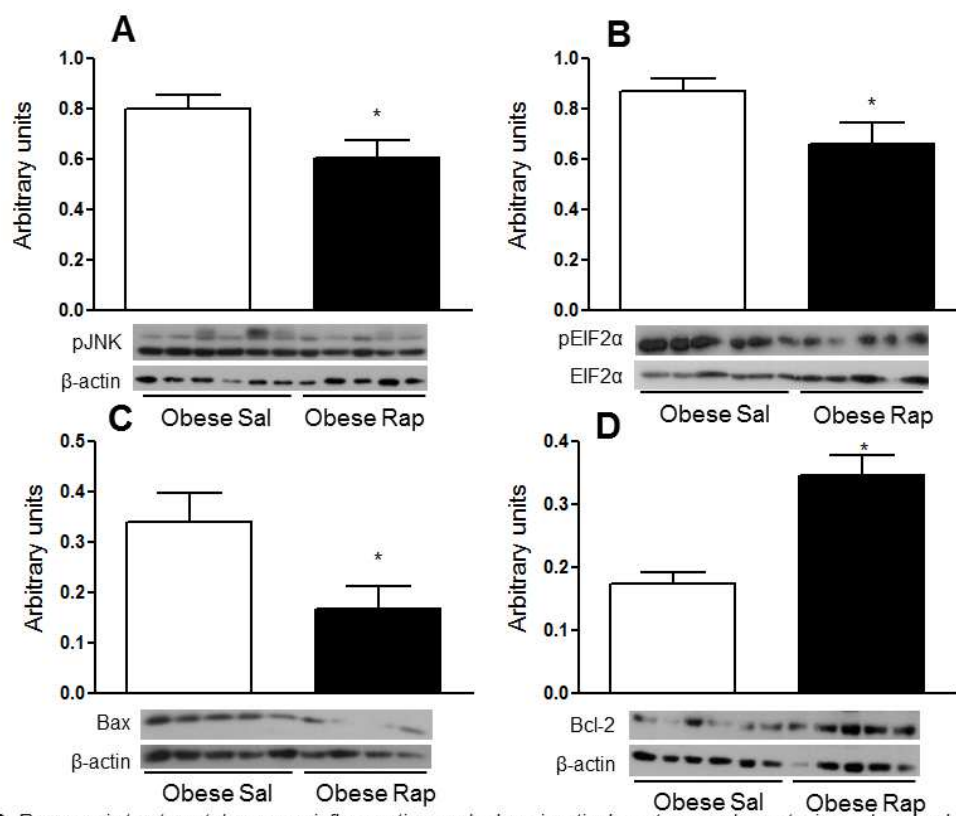


Figure 8. Rapamycin treatment decreases inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis markers in obese mice.

Online Supporting Material

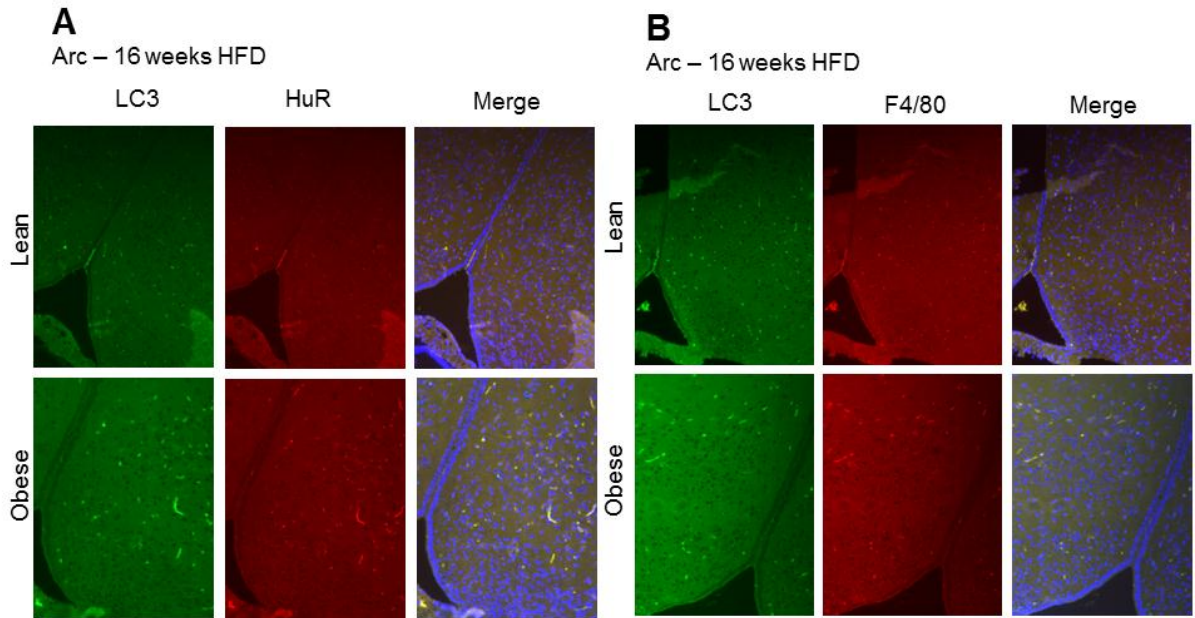
Methods

Antibodies, chemicals and primers

Antibodies against LC3B (ab48394, AbCam, Cambridge, MA, USA), p62 (ab91526), pEIF2S1 (ab32157), pJNK (sc-6254, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), EIF2 (ab32157), Bax (sc493), Bcl-2 (sc492), Anti rabbit IgG (GE 30021019), Goat-anti-Mouse IgG (Zymed 626520), Rabbit-anti-Goat IgG (Zymed 811620), Beta actin (ab8227), were used for western blotting. For immunostaining Vectashield mounting Medium with DAPI (Vector laboratories), LC3B (Cell signaling 3868, Boston, MA, USA), HuR (sc – 20694), F4/80 (sc-25830) and Atg7 (sc-33211) were used. Primers for mouse GAPD, TNFR1, IL-10, IL1 β , MAP1LC3, Atg5, Sqstm1, Becn1 and ULK1 (Applied Biosystems) were used for RT-PCR. Rapamycin (Cayman Chemical Company) was used to induce autophagy.

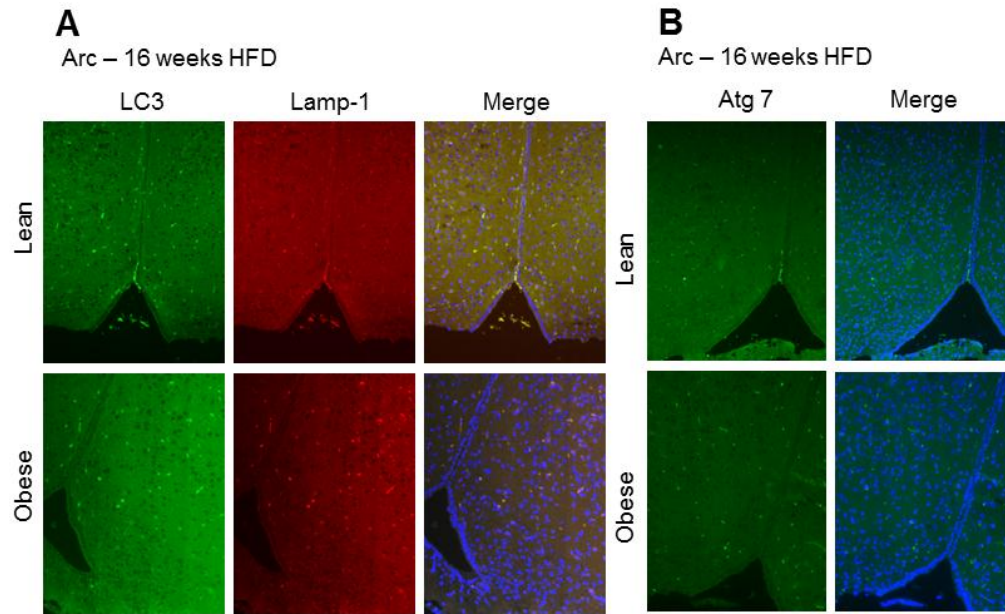
Online Supporting Material

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1 – LC3 colocalizes with hypothalamic neurons and microglia cells. A - Coimmunostaining of LC3 (green) and HuR (red) in arcuate hypothalamic nucleus of lean and obese mice. **B -** Coimmunostaining of LC3 (green) and F4-80 (red) in arcuate hypothalamic nucleus of lean and obese mice DAPI was used for nuclear staining. n=3 animals per group.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2 – Immunostaining of autophagy's markers **A** - Coimmunostaining of LC3 (green) and Lamp-1 (red) in arcuate hypothalamic nucleus of lean and obese mice. **B** - Immunostaining of Atg7 (green). DAPI was used for nuclear staining. n=3 animals per group.

Capítulo II

Discussão e conclusão

Nas últimas décadas houve um grande avanço na caracterização dos mecanismos envolvidos na patogênese da obesidade. Porém, por se tratar de uma doença metabólica resultante de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, diversos novos mecanismos ainda estão sendo investigados. Sabe-se que a falha na regulação da autofagia está relacionada com o envelhecimento e também com a progressão de diversas doenças como câncer, doenças pulmonares, vaculares e infecciosas (Choi *et al.*, 2013). Especificamente no sistema nervoso central, a manutenção correta da autofagia é essencial para a manutenção da funcionalidade de neurônios (Wong, Cuervo, 2010) e sua falha se relaciona com doenças neurodegenerativas como Huntington, Parkinson e Alzheimer (Kegel *et al.*, 2000, Nixon *et al.*, 2005, Ebrahimi-Fakhari, *et al.*, 2011; Vogiatzi *et al.*, 2008). Nesse trabalho, foi investigado o papel da autofagia hipotalâmica em resposta a uma dieta rica em lipídeos.

Primeiramente, demonstramos que a LC3, uma proteína relacionada a via da autofagia, é expressa de forma abundante no núcleo arqueado e se colocaliza com neurônios e também com células da micróglia nessa região. Além disso, de acordo com um trabalho prévio (Meng, Cai, 2011) verificamos que a proteína componente da maquinaria da autofagia Atg7 também é expressa no núcleo arqueado hipotalâmico.

Demonstramos que a obesidade induzida por um longo período de dieta hiperlipídica (16 semanas) foi capaz de diminuir o conteúdo proteico de uma proteína relacionada à autofagia, a LC3-II, e aumentar o conteúdo da proteína substrato da autofagia, a p62. A LC3-II é a forma lipidada da LC3 e integra a membrana do autofagossomo (Glick *et al.*, 2010, Wirth *et al.*, 2013) sendo usada portanto, como medida indireta da quantidade de autofagossomos no tecido. Já a proteína p62 é uma adaptadora entre a via da ubiquitina e a autofagia, reconhecendo agregados ubiquitinados e os encaminhando para degradação pelo autofagolisossomo, no qual a própria p62 também é degradada (Komatsu, 2012). Por este motivo, a p62 atua como um marcador inverso da atividade autofágica. De forma semelhante, Meng e Cai (2011)

demonstraram uma diminuição no conteúdo de proteínas da maquinaria autofágica, Atg7, LC3-II e Atg5, em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 4 a 5 meses. A diminuição de Atg7 por shRNA em hipotálamo mediobasal resultou em ganho de peso e aumento da ingestão alimentar nesses em roedores. Quando em dieta hiperlipídica, os animais com autofagia hipotalâmica deficiente desenvolvem obesidade de forma ainda mais exacerbada, com maior ganho de peso e intolerância a glicose. Ainda, o animal com diminuição de Atg7 hipotalâmica apresenta maior inflamação evidenciada pela ativação de NF- κ B. De forma importante, a deleção de IKK β nesses animais reverte os efeitos observados, sugerindo que, os efeitos metabólicos observados pela diminuição da autofagia hipotalâmica são mediados pela ativação de inflamação nesse modelo.

De forma interessante, com 8 semanas de dieta hiperlipídica não foi observado diminuição no conteúdo de LC3-II, embora a p62 esteja aumentada. Tal fato pode refletir uma demanda aumentada de proteínas mal-formadas. Não podemos excluir a possibilidade de que haja apenas um aumento de conteúdo de p62 resultante de expressão aumentada dessa proteína, já que a expressão de p62 pode ser induzida em situações de estresse (Jain *et al.*, 2010).

O simples fato de existir um aumento no conteúdo de p62 em animais obesos já representa um evento interessante pois, essa proteína pode regular vários processos de sinalização celular. Por exemplo, a p62 está envolvida com a ubiquitinação de TRAF6 (Komatsu *et al.*, 2012). Essa interação entre a p62 e a TRAF6, que tem atividade de enzima ubiquitina ligase (E3), promove a autoubiquitinação da TRAF6, que, por sua vez, é importante para a transferência de ubiquitinas para proteínas alvo (Moscat *et al.*, 2007). A atividade de enzima ubiquitina da TRAF6 é essencial na cascata de sinalização do TLR4 e ativação de NF- κ B, por exemplo (Akira, Takeda, 2004). Ainda, a p62 parece interagir com a proteína relacionada a via extrínseca da apoptose, a caspase 8. Um estudo mostrou que quando a via da apoptose é ativada, a caspase 8 sofre ubiquitinação e então, a p62 promove a agregação de caspase 8 estimulando assim seu processamento e ativação. Com isso, ocorre maior ativação das caspases efetoras e conseqüentemente, maior ativação da via da apoptose (Jin *et al.*, 2009).

Além da associação de p62 com a via da apoptose, a própria via da autofagia pode agir ativando a apoptose. Young *et al* (2012) demonstraram que a membrana do autofagossomo age como uma plataforma para a ativação de caspase 8.

Com relação a importância da autofagia para os neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle da fome, alguns trabalhos envolvendo a manipulação genética de Atg7 demonstraram seu papel crucial. Quando a autofagia é inibida de forma específica em neurônios AgRP, a resposta fisiológica ao jejum em aumentar a expressão desse neurotransmissor é abolida, levando ao aumento de POMC e α -MSH. Tal fato gerou um fenótipo magro em camundongos (Kaushik *et al.*, 2011). Em contrapartida, quando há inibição de Atg7 em neurônios hipotalâmicos POMC, ocorre o acúmulo de p62 que se localiza com proteínas ubiquitinas, sugerindo formação de agregados proteicos. Com relação ao fenótipo, o camundongo que não possui autofagia eficiente em neurônios POMC tem maior peso, consequência de maior ingestão alimentar e diminuição de gasto energético. Além disso, esse animal desenvolve uma intolerância a glicose ainda maior quando em dieta hiperlipídica. O aumento da ingestão alimentar é causado em parte pela resistência à leptina encontrada nesse animal (Quan *et al.*, 2012). Em um outro trabalho em que também investigou-se a repercussão da deleção de Atg7 em neurônios hipotalâmicos POMC evidenciou-se aumento de peso e adiposidade, intolerância a glicose, acúmulo de agregados marcados com ubiquitinas e p62 e interessante, diminuição da projeção axonal de neurônios POMC (Coupé *et al.*, 2012).

Demonstramos que o tratamento icv ácido graxo esteárico, um ácido graxo saturado de cadeia longa, é capaz de levar ao acúmulo de p62 em hipotálamo de camundongos. Nos últimos anos, diversos trabalhos demonstraram que ácidos graxos livres séricos em excesso são responsáveis pela resistência a insulina (Griffin *et al.*, 1999; Boden *et al.*, 1995). Além disso, ácidos graxos saturados são capazes de ativar células da micróglia via TLR4 (Wang *et al.*, 2012) e ativam vias inflamatórias em astrócitos (Gupta *et al.*, 2012). Especificamente no hipotálamo, ácidos graxos saturados de cadeia longa são responsáveis pela ativação de TLR4 e indução de estresse de retículo endoplasmático (Milanski *et al.*, 2009).

No experimento seguinte, demonstramos que a administração de rapamicina, uma droga inibidora do mTORC1, via intracerebroventricular (icv) por 5 dias foi capaz de aumentar o conteúdo de LC3-II e diminuir p62 hipotalâmica, sugerindo que o tratamento foi capaz de restaurar a autofagia em camundongos obesos. Com isso, houve diminuição na fosforilação de JNK1 e EIF2 α , sugerindo uma diminuição na ativação de via inflamatória e de estresse de retículo endoplasmático, respectivamente. Além disso, a indução de autofagia em animais obesos diminuiu o conteúdo de Bax e aumentou o conteúdo de Bcl-2, sugerindo diminuição da ativação de vias apoptóticas em hipotálamo de animais obesos. Esses resultados revelam que a indução de autofagia diminuiu a ativação de processos celulares relacionados ao estresse.

A rapamicina parece exercer efeitos importantes na atividade de neurônios hipotalâmicos. Em um modelo animal de obesidade induzida pela idade avançada, ocorre a ativação anômala de mTOR em neurônios POMC. Tal fato leva ao aumento da atividade de canais de potássio sensíveis à ATP, levando à diminuição da atividade dessa população neuronal. De forma interessante, a administração icv de rapamicina e consequente inibição da mTOR causa perda de peso em animais senis relacionada ao aumento da atividade de neurônios POMC (Yang *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos mostram que a rapamicina exerce efeitos deletérios na homeostase glicêmica de roedores, apesar de paradoxalmente melhorar outros parâmetros como adiposidade (Chang *et al.*, 2009, Houde *et al.*, 2010). Porém, Fang *et al.* (2013) demonstraram que o tempo de tratamento com rapamicina resulta em diferentes efeitos sob o metabolismo de camundongos. Nas primeiras semanas de tratamento foi observada uma intolerância a glicose nesses animais, porém, após 20 semanas de tratamento essa intolerância foi revertida. Observamos uma melhora na sensibilidade à glicose após 30 minutos do desafio com glicose intraperitoneal em animais obesos tratados com rapamicina, sugerindo que, o efeito da rapamicina diretamente no SNC é diferente do encontrado na periferia.

Além disso, a autofagia está relacionada com componentes do sistema imune inato e adaptativo, e, no contexto de inflamação, atua como um regulador negativo de

sinalização de citocinas (Virgin, Levine, 2009). Por exemplo, em macrófagos a autofagia reduz os níveis de IL-1 β por degradar essa citocina em resposta à LPS. *In vivo*, a indução de autofagia por rapamicina é capaz de reduzir os níveis séricos dessa citocina após estímulo com LPS (Harris *et al.*, 2011), demonstrando assim o importante papel da autofagia no controle de inflamação. Tal fato vai de encontro com o resultado deste trabalho que mostra que a indução de autofagia hipotalâmica em animais obesos reduziu a ativação de via inflamatória. Portanto, a autofagia é essencial no controle da inflamação e a falha nesse processo pode auxiliar na perpetuação do sinal inflamatório presente na obesidade, responsável pela indução de dano em neurônios hipotalâmicos relacionados com o controle da fome e termogênese.

De forma contrária, componentes do sistema imune podem regular o processo da autofagia. O TLR4 é capaz de regular a indução de autofagia (Xu *et al.*, 2007) de forma dependente da associação de Beclin-1 com proteínas adaptadoras da via do TLR4, MyD88 e Trif, fato que se associa com a menor interação da Beclin-1 com Bcl-2 (Shi, Kehrl, 2008). Além disso, a TRAF6 promove a ubiquitinação da Beclin-1 após a indução de TLR4 para induzir autofagia mediada por esse receptor. De forma contrária, a deubiquitinação da Beclin-1 pela proteína A20 limita a indução de autofagia mediada por TLR4 (Shi, Kehrl, 2010).

A ativação prolongada de NF- κ B por estimulação com *E. Coli* em macrófagos leva à diminuição de autofagia e morte celular (Schlottmann *et al.*, 2008). Além disso, a cotransfecção de micróglia infectada com vírus da imunodeficiência símia ou o estímulo com TNF α resulta em diminuição de autofagia e morte neuronal. Esses trabalhos demonstram que a exposição prolongada à inflamação pode ocasionar diminuição da autofagia, o que sugere que a inflamação presente na obesidade pode ser a causa da diminuição da autofagia em hipotálamo de camundongos obesos.

Adicionalmente ao controle da inflamação, a manutenção da autofagia basal é importante na remoção de proteínas e organelas disfuncionais e de agregados proteicos. A falha na indução da autofagia pode causar o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, levando ao estresse oxidativo e também o acúmulo de proteínas disfuncionais gera

formação de agregados proteicos (Yang, Klionsky, 2009; Ravikumar *et al.*, 2010). Dados não publicados do nosso grupo demonstram a presença de agregados proteicos ubiquitinados em hipotálamo de camundongos com 16 semanas de dieta hiperlipídica, reforçando a hipótese de que ocorre falha no processo autofágico com obesidade crônica.

A falha na autofagia em SNC resulta em neurodegeneração em camundongos e está relacionada com a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, Huntington e Parkinson (Kegel *et al.*, 2000, Nixon *et al.*, 2005, Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2011 Vogiatzi *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos demonstram que existe uma correlação positiva com a obesidade e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Whitmer *et al.*, 2008; Gustafson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 1999, Logroscino *et al.*, 1996, Hellenbrand *et al.*, 1996) Sabendo da relação entre autofagia e doenças neurodegenerativas, a falha nesse processo em modelo de obesidade sugere que esse fato pode representar uma importante associação entre a obesidade e doenças como Alzheimer.

Portanto, a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos leva à diminuição da autofagia hipotalâmica, fato que pode contribuir para a perpetuação da inflamação local e indução de morte neuronal. Além disso, o ácido graxo esteárico parece modular a via da autofagia levando ao acúmulo de uma proteína substrato da via, a p62, o que sugere um acúmulo de agregados proteicos. De forma importante, a falha em regular a autofagia em camundongos obesos representa um importante mecanismo que pode estar associado com o risco aumentado de doenças degenerativas na obesidade.

Referências

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**. 2004 July; 4(7):499-511.

Alirezaei M, Kemball CC, Flynn CT, Wood M, Whitton JL, Kiosses WB. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. **Autophagy**. 2010 Ago.; 6(6):702-10.

Alirezaei M, Kiosses WB, Flynn CT, Brady NR, Fox HS. Disruption of Neuronal Autophagy by Infected Microglia Results in Neurodegeneration. **PLoS ONE**, 2008 Ago 3(8):1-11.

Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009): Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. **Rio de Janeiro: IBGE**; 2010.

Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. **J. Clin. Invest**. 2009 set;119(9):2577–89.

Boden G, Chen X, Rosner J, Barton M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. **Diabetes**. 1995 Oct;44(10):1239-42.

Chand S, Mehta N, Bahia MS, Dixit A, Silakari O. Protein kinase C-theta inhibitors: a novel therapy for inflammatory disorders. **Curr Pharm Des**. 2012;18(30):4725-46.

Chang GR, Wu YY, Chiu YS, Chen WY, Liao JW, Hsu HM, Chao TH, Hung SW, Mao FC. Long-term administration of rapamycin reduces adiposity, but impairs glucose tolerance in high-fat diet-fed KK/HIJ mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2009 Sep;105(3):188-98.

Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. **N Engl J Med**. 2013 Feb 14;368(7):651-62.

Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Biochim Biophys Acta**. 2012 Jan;1824(1):3-13.

Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, Komatsu M, Horvath TL, Bouret SG. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. **Cell Metab**. 2012 Feb; 8;15(2):247-55.

De Jonghe et al. Deficiency of PTP1B in POMC neurons leads to alterations in energy balance and homeostatic response to cold exposure. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2011 Jun;300(6):1002-11.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**. 2005 Oct; 146(10): 4192-9.

Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z, Rockenstein E, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ, Unni VK. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein. **J Neurosci**. 2011 Oct 12;31(41):14508-20.

Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. **JAMA**. 2003 Apr 9;289(14):1799-804.

Esposito K, Pontillo A, Ciotola M, Di Palo C, Grella E, Nicoletti G, Giugliano D. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. **J Clin Endocrinol Metab**. 2002 Aug;87(8):3864-6.

Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, Wang F, Javors MA, Chen J, Sun LY, Bartke A. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. **Cell Metab**. 2013 Mar 5;17(3):456-62.

Galic S, Hauser C, Kahn BB, Haj FG, Neel BG, Tonks NK, Tiganis T. Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP. **Mol Cell Biol.** 2005 Jan;25(2):819-29.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol.** 2010 May;221(1):3-12.

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

Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **J Neurochem.** 2012 Mar;120(6):1060-71.

Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. **Arch Intern Med.** 2003 163(13):1524–1528.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature.** 2006 June; 441(15):885-9.

Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschoop J, *et al.* Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. **J Biol Chem.** 2011; 286(11):9587-97.

Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G (1996) Diet and Parkinson's disease. II: a possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case-control study. **Neurology.** 1996 47(3):644–650.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. 1993 Jan 1;259(5091):87–91.

Houde VP, Brûlé S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, Deshaies Y, Marette A. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. **Diabetes**. 2010 Jun;59(6):1338-48.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. 2006 Dec. 444(14): 860-7.

Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrinol. Metab**. 2006 Nov;17(9):365–71.

Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. **J Biol Chem**. 2010 Jul 16;285(29):22576-91.

Johnson CC, Gorell JM, Rybicki BA, Sanders K, Peterson EL. Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. **Int J Epidemiol**. 1999 28(6):1102–1109

Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. **Cell**. 2009 May 15;137(4):721-35.

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death Differ**. 2011 Apr;18(4):571-80.

Kaushik S, Rodriguez-Navarro JA, Arias E, Kiffin R, Sahu S, Schwartz GJ, Cuervo AM, Singh R. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. **Cell Metab**. 2011 Aug 3;14(2):173-83.

Kegel, K.B. *et al.* Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. **J. Neurosci.** 20, 7268–7278 (2000).

Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. **Pharmacol Res.** 2012 Dec;66(6):457-62.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. **Nature.** 2000 abr 6;404(6778):635–43.

Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. **Nature.** 2011; 20(77330):323-35.

Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case–control study. **Ann Neurol.** 1996 39(1):89–94.

Mandl J, Mészáros T, Bánhegyi G, Hunyady L, Csala M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. **Trends Endocrinol Metab** 2009. Apr; 20(4): 194-201.

Marsland BJ, Kopf M. T-cell fate and function: PKC-theta and beyond. **Trends Immunol.** 2008 Apr;29(4):179-85.

Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase beta (IKK β)/NF- κ B pathway. **J Biol Chem.** 2011. Sep; 16;286(37):32324-32.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE *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.** 2004 Jan.; 29(2):359-370.

Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. **Curr Opin Cell Biol.** 2010 Apr.;22(2):132-39.

Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**. 2004 Nov; 145(11): 4880-89.

Nedelsky NB, Todd PK, Taylor JP. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. **Biochim Biophys Acta**. 2008 Dec;1782(12):691-9.

Nixon, R.A. *et al*. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 64, 113–122 (2005).

Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. **Nat Med**. 2012 Jul; 18:1279–1285.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **J Biol Chem**. 2007 Aug 17;282(33):24131-45.

Picardi PK, Calegari VC, Prada PO, Moraes JC, Araújo E, Marcondes MC, Ueno M, Carnevalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. **Endocrinology**. 2008 Aug;149(8):3870-80.

Quan W *et al*. Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. **Endocrinology**. 2012 Apr;153(4):1817-26.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC *et al*. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**. 2010 Oct;90(4):1383-435.

Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-

1 and activating VPS34 lipid kinase. **Nat Cell Biol.** 2013 May.

van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, Chaim EA, Pareja JC, Geloneze B, Li LM, Cendes F, Velloso LA. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. **Diabetes.** 2011 Jun;60(6):1699-704.

Schlottmann S, Buback F, Stahl B, Meierhenrich R, Walter P, Georgieff M, Senftleben U. Prolonged classical NF-kappaB activation prevents autophagy upon E. coli stimulation in vitro: a potential resolving mechanism of inflammation. **Mediators Inflamm.** 2008;2008:725854.

Shi CS, Kehrl JH. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. **J Biol Chem.** 2008 Nov 28;283(48):33175-82.

Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. **Sci Signal.** 2010 May 25;3(123):ra42

Szegezdi E, MacDonald DC, Chonghaile TN, Gupta S, Samali A. Bcl-2 family on guard at the ER. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2009 Mar. 296(5): 941-53.

Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **Lancet.** 2011 ago 27;378(9793):804–14.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest.** 2012 Jan; 122(1):153-62.

Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. **Neuroimmunomodulation.** 2008 Sept.; 15(3): 189-93.

Velloso, LA. The brain is the conductor: diet induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2009;53-2.

Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. **Nat Immunol.** 2009 May;10(5):461-70.

Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. **J Biol Chem.** 2008 Aug 29;283(35):23542-56.

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation.** 2002 Feb 19;105(7):804-9.

Wang Z, Liu D, Wang F, Liu S, Zhao S, Ling EA, Hao A. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. **Br J Nutr.** 2012 Jan;107(2):229-41.

White CL, Whittington A, Barnes MJ, Wang Z, Bray GA, Morrison CD. HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2009 Feb;296(2):291-9.

Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. **Neurology.** 2008 71 (14):1057–1064

Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation-The role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. **Semin Cancer Biol.** 2013 May.

Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. **Nat Neurosci.** 2010 July; 13(7): 805-11.

WHO | Obesity and overweight [Internet]. [citado 2011 out 2];Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.

World Health Organization. The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. **Geneva:WHO**; 2002. 230p.

Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2009;335:1-32.

Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil, GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. **Cell Metab**. 2010 June; 11(6):467-78.

Yang Shi-Bing, Tien An-Chi, Boddupalli G, Xu AW, Jan YN, Jan LY. Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. **Neuron**. 2012 August 9; 75(3): 425–436.

Yi Xu, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. **Immunity**. 2007 July; 27(1): 135–144.

Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, Sharma AK, Amin S, Hu CD, Zhang J, Kester M, Wang HG. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. **J Biol Chem**. 2012 Apr 6;287(15):12455-68.

Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D: Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**. 2008 Oct. 135(1): 61-73.

Anexo A - Parecer do comitê de ética em pesquisa



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Caracterização da autofagia em hipotálamo de diferentes modelos animais de obesidade" (protocolo nº 2623-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Marciane Milanski / Mariana Portovedo de Oliveira Araújo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de março de 2012.

Campinas, 06 de março de 2012.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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

Anexo B - Co-autoria de artigos publicados

Int J Clin Exp Med 2013;6(2):98-104
www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/UJCEM1212015

Original Article

Toll-like receptor 4, F4/80 and pro-inflammatory cytokines in intestinal and mesenteric fat tissue of Crohn's disease

Raquel F Leal^{1,2}, Marciane Milanski², Maria de Lourdes S Ayrizono¹, Andressa Coope², Viviane S Rodrigues^{1,2}, Mariana Portovedo², Luiza M F Oliveira¹, João J Fagundes¹, Cláudio S R Coy¹, Lício A Velloso²

¹Coloproctology Unit, Surgery Department, University of Campinas (UNICAMP), Medical School, São Paulo, Brazil;

²Laboratory of Cell Signaling, Internal Medicine Department University of Campinas (UNICAMP), Medical School, São Paulo, Brazil

Received December 15, 2012; Accepted January 11, 2013; Epub January 26, 2013; Published February 6, 2013

Abstract: Introduction: Crohn's disease (CD) is a chronic intestinal ailment with a multifactorial etiology, whose incidence has increased during the last three decades. Recently, a role for mesenteric fat has been proposed in CD pathophysiology, since fat hypertrophy is detected nearby the affected intestinal area; however, there are few studies on this aspect. Aim: To evaluate inflammatory activity in intestinal mucosa and mesenteric fat tissue of patients with CD and controls. Materials and Methods: Ten patients with ileocecal CD and 18 patients with non-inflammatory disease (control groups) were studied. The specimens were snap-frozen and the expression of TLR-4, F4/80, IL-1 β and IL-6 were determined by immunoblot of protein extracts. TLR4 RNA level were measured using RT-PCR. The t Test was applied ($p < 0.05$). The local ethical committee approved the study. Results: The intestinal mucosa of CD group had significantly higher protein levels of TLR-4, F4/80, IL-1 β and IL-6 than the controls. The gene expression of TLR4 was lower in the intestinal mucosa of CD compared to the control group. Regard the mesenteric fat tissue, there was no statistical difference related to TLR-4, F4/80, IL-1 β and IL-6 proteins expression. Conclusions: These findings may result from an up-regulation of macrophage activation and intracellular pathways activated by bacterial antigens, which are more important in intestinal mucosa than fat tissue in CD patients. This may represent an anomalous regulation of innate immunity and could contribute to the production of proinflammatory mediators and disease development.

Keywords: Crohn's disease, inflammatory bowel disease, innate immunity, cytokines

Introduction

The increasing incidence of inflammatory bowel disease (IBD), particularly Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), has raised queries regarding the pathogenesis and factors potentially involved in the onset of these diseases. CD and UC are multifactorial chronic intestinal diseases, which occur mainly in the second and third decades of life [1].

Macrophages are key cells involved in IBD, since they are part of the innate immune system at the interface with the external environment, and are responsible for the release of various cytokines such as TNF- α and IFN- γ . Once released, these proinflammatory cyto-

kines induce the activation of their respective receptors triggering the activation of an intracellular signaling cascade ultimately leading to the activation of nuclear transcription factors NF- κ B and STAT-1, which control the transcription of inflammatory factors [2, 3].

The membrane receptors TLRs (Toll-like receptors) that mediate the recognition of antigens of the intestinal lumen as lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN) or flagellin (Flag) were also associated with CD due to the activation of NF- κ B via MyD88, thereby increasing the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8 and susceptibility to invasion by pathogens in the lamina propria, thus perpetuating the inflammatory process [4,

Autophagy is decreased in mesenteric fat tissue but not in intestinal mucosae of patients with Crohn's disease

Raquel F. Leal · Cláudio S. R. Coy · Lício A. Velloso ·
Sushila Dalal · Mariana Portovedo ·
Viviane S. Rodrigues · Andressa Coope ·
Mária L. S. Ayrizono · João J. Fagundes ·
Marciane Milanski

Received: 22 June 2012 / Accepted: 16 August 2012 / Published online: 5 September 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Crohn's disease (CD) is a chronic intestinal disease with a multifactorial etiology. Recently, a role for mesenteric fat has been proposed in CD pathophysiology, since fat hypertrophy is detected close to the affected intestinal area; however, there are few studies regarding autophagy and the hypertrophied mesenteric tissue in CD. To evaluate autophagy-related proteins in intestinal mucosae and mesenteric fat of patients with CD and controls, patients with ileocecal CD (CD Group) and with non-inflammatory disease (FC Group) selected for surgery were studied. Expression of LC3-II was determined by immunoblotting of protein extracts. In addition, *beclin-1*, *LC3* and *Atg16L1* RNA levels were measured using RT-PCR. The expression of LC3-II was significantly lower in the mesenteric tissue and higher in intestinal mucosae of CD when compared to controls. However, mRNA expression of autophagy-related proteins was similar when comparing the mesenteric fat groups. These findings suggest a defect in autophagy activation in the mesenteric fat tissue of CD individuals, which could be involved in the maintenance of the inflammatory process.

Keywords Crohn's disease · Inflammatory bowel disease · Autophagy · Cytokines · Mesenteric fat

Introduction

Autophagy seems to be essential for intestinal mucosal immunity and recent studies show that mutations in autophagy-related genes are associated with CD (Cummings et al. 2007; Parkes et al. 2007). Association of CD with the gene locus, ATG16L1, has been reported and patients who have more mutant alleles develop a more severe course of disease, compared to those patients with inflammatory CD phenotype only (Weersma et al. 2009).

Although phenotypic variation is seen in surgical specimens from CD patients, macroscopic aspects are notorious, especially with regard to the thickening of the mesenteric fat next to the affected intestinal area (Golder 2009; Zulian et al. 2012). Mesenteric fat hypertrophy and wrapping of the bowel are characteristic of CD (Bertina et al. 2010). Few reports discuss the role of the mesenteric fat tissue in CD, however, no studies have evaluated autophagy in this tissue. Therefore, in order to compare the autophagy activity (called 'macroautophagy') in fat and intestinal tissue between CD patients and controls, we employed immunoblotting to determine LC3 protein expression and RT-PCR to determine the relative RNA quantification of *beclin-1*, *LC3II*, and *Atg16L1* in mesenteric fat tissue groups.

Methods

Mucosal biopsies were taken from ten patients with ileocecal CD. The presence of disease activity was assessed by colonoscopy before surgery and all patients had a Crohn's disease

R. F. Leal · C. S. R. Coy · V. S. Rodrigues · M. L. S. Ayrizono ·
J. J. Fagundes
Coloproctology Unit, Surgery Department,
University of Campinas (UNICAMP), Medical School,
Campinas, São Paulo, Brazil

R. F. Leal (✉) · L. A. Velloso · M. Portovedo · V. S. Rodrigues ·
A. Coope · M. Milanski
Laboratory of Cell Signaling, Internal Medicine Department,
University of Campinas (UNICAMP), Medical School,
Rua Arqueto José Augusto Silva, 1023, apto 42B,
Mansões Santo Antônio,
13087-570, Campinas, São Paulo, Brazil
e-mail: raquelleal@mpc.com.br

S. Dalal
Department of Medicine, Section of Gastroenterology,
University of Chicago,
Chicago, IL, USA