

DANIELA FALEIROS BERTELLI

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO
CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E DO PESO
CORPORAL – PARTICIPAÇÃO DA 5PTASE IV**

CAMPINAS

2006

DANIELA FALEIROS BERTELLI

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO
CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR E DO PESO
CORPORAL – PARTICIPAÇÃO DA 5PTASE IV**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia
estrutural, molecular, celular e do desenvolvimento.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2006

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

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

B461m	Bertelli, Daniela Faleiros Mecanismos moleculares envolvidos no controle da ingestão alimentar e do peso corporal-participação da 5PTASE IV. / Daniela Faleiros Bertelli. Campinas, SP : [s.n.], 2006. Orientador : Lício Augusto Velloso Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Insulina. 2. Hipotálamo. I. Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

Título em ingles: Involved molecular mechanisms in the control of the alimentary ingestion and the corporal weight-participation of 5PTASE IV

Keywords:

- **Insulin**
- **Hypothalamus**

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Profº.Drº. Lício Augusto Velloso

Profª Drª Eliane Beraldi Ribeiro

Profº Drº José Antônio Rocha Gontijo

Profº.Drº Francesco Langone

Profº Drº Márcio Torsoni

Data da defesa: 23 / 06 / 2006

Banca examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

MEMBROS:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Prof ^a . Dr ^a . Eliane B. Ribeiro

Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

Prof. Dr. Francesco Langone

Prof. Dr. Márcio Torsoni

MEMBROS SUPLENTE

Prof. Dr. Kleber Frankini

Prof. Dr. Wilson Nadruz

Prof ^a . Dr ^a . Silvana Bordin
--

Prof ^a . Dr ^a . Carla Roberta Oliveira Carvalho

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

Data: 23/06/2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Enderson e Sônia

Por uma vida toda de dedicação.

Ao meu marido Nicolau

Pela paciência e cumplicidade.

Eu os amo muito.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador,
Prof. Dr. Lício

Agradeço pela paciência... pela confiança...
Pela compreensão que teve durante todos esses anos...e
Pela amizade que criamos durante esse tempo...

Com nossa convivência aprendi o que é ser um professor de verdade
Pois via um homem inteligente, bem humorado, e
disposto a fazer o melhor todos os dias...

Tenho enorme orgulho do nosso trabalho
É uma grande satisfação poder trabalhar com uma pessoa como você
Um grande cientista...
Um exemplo de professor...

Minha eterna gratidão
Aquele que tanto admiro

Daniela

Ao meu co-orientador,
Prof. Dr. Boschero

Agradeço por todas as oportunidades que o senhor me deu
Sinceramente, agradeço pela maneira gentil
com que sempre me recebeu...
mesmo diante de tantas lamentações...

Professor, espero que a concretização deste projeto seja algo de orgulho,
pois se cheguei até aqui foi porque o senhor me deu a mão...

Sempre o terei como um homem simples, de inteligência ímpar
E ainda de extrema dedicação, profissionalismo e
acima de tudo aquele que tem o dom de saber viver...

Obrigada por tudo...
Da sua mestrandia

Daniela

Agradeço à Deus
Pela vida abençoada que tenho
e por estar comigo na realização deste sonho.

A meu marido Nicolau
Pelo apoio e paciência nos momentos de maior dificuldade...
Obrigada pelo carinho.

Aos meus avós,
Francisco, Maria Aparecida e Iná
Pelo exemplo de vida, de força e humildade.
Mesmo distante, me incentivaram, oravam e torceram pelos meus objetivos...
Eu os Amo muito.

Aos meus tios e tias
Agradeço pela torcida sempre presente no decorrer da minha vida acadêmica.
Obrigada pelo incentivo e apoio.
Vocês foram sempre muito importantes na minha vida.

A minha irmã Priscila
Que os laços que nos unem, sejam capazes de nos dar força e esperança a
cada novo caminho a ser conquistado.

A querida amiga Luciane Fernanda,
Obrigada pelo apoio e atenção,
sua ajuda foi fundamental para ter forças e tocar em frente.
Nunca vou esquecer tudo que fez por mim...

Ao Prof. Dr. Mário Saad e Prof^a. Dra. Iscia Cendes
Pela contribuição ímpar e pela oportunidade de realização
deste trabalho em seus laboratórios.

A amiga Eliana Araújo,
Pela grandiosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho,
pela grande amizade, e sobretudo pela pessoa maravilhosa que é.
Obrigada.

Ao amigo Márcio Torsoni,
Pela forma atenciosa e prestativa com que atendeu
aos meus pedidos de ajuda.
Muito Obrigada.

Aos amigos, Maria Esméria, Mirian, Henrique, Márcio Pereira, Maristela, Graziela,
José Barreto, Wilson, Marcos Toyama e outros colegas
Pela amizade sincera e convivência sadia
Vocês contribuíram sempre de maneira positiva.

As amigas Patrícia e Telma
Apesar da distância que nos separa, os pensamentos positivos tiveram
uma participação especial durante este período.
Obrigada pelo apoio.

Aos amigos Letícia e Marcelo,
A torcida para que tudo saísse bem
foi de grande valor em todos os momentos durante esta tese.
Obrigada pelo apoio constante.

Ao funcionário Márcio
Tenho grande estima pela valiosa ajuda que me prestou,
sempre torcendo pelos resultados positivos.

Ao funcionário Sr. Luis
Nunca me esquecerei o quanto o senhor fez por mim
nos momentos que mais precisei.
Obrigada.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	<i>xiv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	18
2- OBJETIVOS.....	25
3- RESULTADOS.....	27
4- DISCUSSÃO.....	63
5- CONCLUSÃO.....	69
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7- ANEXOS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

α Py	antifosfotirosina
μ Ci	microCi
AgRP	proteína relacionada ao agouti
Akt	proteína serina quinase
AS	antisense
ATP	adenosina trifosfato
BLAST	ferramenta de pesquisa de alinhamento
CART	transcrito relacionado a cocaína e anfetamina
CCK	colecistocinina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
HPLC	cromatografia líquida por alta pressão
125 I	isótopo de iodo 125
ICV	intracerebroventricular
INPP5e	inositol polifosfatase 5e
IR	receptor de insulina
IRS1	substrato 1 do receptor de insulina
IRS2	substrato 2 do receptor de insulina
JAK2	Janus kinase
kDa	quilo Dalton
LY294002	inibidor da PI3-kinase
MAPK	proteína quinase ativadora da mitogênese
MSH	hormônio estimulante do melanócito
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NPY	neuropeptídeo Y

PCR	reação em cadeia da polimerase
PI	fosfatidilinositol
PIP	fosfoinositóis fosforilados
PI _{3,4} -P ₂	fosfatidilinositol-bifosfato
PI _{3,4,5} -P ₃	fosfatidilinositol-trifosfato
PI3-kinase	fosfatidilinositol 3-quinase
PDK	quinase dependente de fosfatidilinositol
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonila
POMC	proopiomelanocortina
PYY	peptídeo YY
PTEN	fosfatase e homólogo tensina
PY	fosfotirosina
p85-PI3-kinase	subunidade da PI3-quinase
5ptase IV	5-fosfatase tipo IV
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil
sulfato de	sódio
SH2	segunda homologia do src
SH3	terceira homologia do src
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHIP	família da inositol polifosfatase que contém o domínio SH2
SHIP1	inositol 5-fosfatase que contém o domínio SH2 - 1
SHIP2	inositol 5-fosfatase que contém o domínio SH2 - 2
STAT3	transdutor do sinal e ativador da transcrição
TLC	cromatografia de camada fina

	PÁG.
Tabela 1- Alignment of the sequences of the 5ptase IV cDNA clone obtained from <i>Rattus norvegicus</i> hypothalamus and the 5ptase IV complete codes deposited at the NCBI-NIH GeneBank, gi 62644778	55
Figure 1- Characterization of the immunoreactivity towards SHIP2 and SHIP1 in the hypothalamus of rats.....	56
Figure 2- Alignments of 5ptase IV with SHIP2 and SHIP1 and characterization of a polyclonal antibody to 5ptase IV.....	57
Figure 3- 5ptase IV expression in the central nervous system.....	58
Figure 4- Insulin induces the tyrosine phosphorylation and catalytic activation of 5ptase IV.....	59
Figure 5- Determination of phosphatidylinositols by anion exchange.....	60
Figure 6- Inhibition of 5ptase IV expression reduces food intake and promotes loss of body weight.....	61
Figure 7- Proposed scheme for 5ptase IV interaction with the insulin signaling pathway.....	62

RESUMO

A enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-kinase) exerce uma importante função na transdução dos sinais anorexigênicos e termogênicos enviados pela insulina e leptina em primeira ordem aos neurônios do núcleo arqueado no hipotálamo. A cascata de sinais intracelulares gerados pela ativação da PI3-kinase depende da atividade coordenada de inositol-fosfatases específicas. Neste trabalho, mostramos que a *phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV* (5ptase IV) está altamente expressa em neurônios do núcleo arqueado e lateral do hipotálamo. Submetido ao tratamento intracerebroventricular (ICV) com insulina, a 5ptase IV sofre fosforilação em tirosina de acordo com um padrão tempo-dependente, a qual segue os mesmos moldes da sinalização da insulina através do seu receptor (IR), seu substrato-2 (IRS2) e da PI3-kinase. Para avaliar a participação da 5ptase IV na ação da insulina no hipotálamo, trabalhamos com um oligonucleotídeo antisense específico para esta enzima. O tratamento dos ratos com este oligonucleotídeo durante quatro dias reduziu a expressão hipotalâmica da 5ptase IV em aproximadamente 80%. Tal fato foi acompanhado pela redução de 70% na sua fosforilação induzida pela insulina, e ainda pelo aumento na quantidade basal dos inositóis fosforilados no hipotálamo. Finalmente, a inibição da expressão da 5ptase IV no hipotálamo pelo oligonucleotídeo antisense, resultou na redução da ingestão média diária de alimentos, na perda de massa corporal e ainda na redução da ingestão alimentar em 12 horas. Desta forma, a 5ptase IV é um potente regulador da sinalização através da PI3kinase no hipotálamo e pode tornar-se um alvo interessante para a terapêutica da obesidade e para as desordens relacionadas.

ABSTRACT

The enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) exerts an important role in the transduction of the anorexigenic and thermogenic signals delivered by insulin and leptin to first-order neurons of the arcuate nucleus in the hypothalamus. The termination of the intracellular signals generated by the activation of PI 3-kinase depends on the coordinated activity of specific inositol phosphatases. Here, we show that phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV (5ptase IV) is highly expressed in neurons of the arcuate and lateral nuclei of the hypothalamus. Upon intracerebroventricular (ICV) treatment with insulin, 5ptase IV undergoes a time-dependent tyrosine phosphorylation, which follows the same patterns of canonical insulin signaling through the insulin receptor, IRS-2, and PI 3-kinase. To evaluate the participation of 5ptase IV in insulin action in hypothalamus, we employed a phosphorthioate modified antisense oligonucleotide specific for this enzyme. The treatment of rats with this oligonucleotide for four days reduced the hypothalamic expression of 5ptase IV by ~80%. This was accompanied by a ~70% reduction of insulin-induced tyrosine phosphorylation of 5ptase IV and by an increase in basal accumulation of phosphorylated inositols in the hypothalamus. Finally, inhibition of hypothalamic 5ptase IV expression by the antisense approach resulted in reduced daily food intake, body weight loss and decreased 12 h spontaneous food intake. Thus, 5ptase IV is a powerful regulator of signaling through PI 3-kinase in hypothalamus and may become an interesting target for therapeutics of obesity and related disorders.

1- INTRODUÇÃO

Obesidade é um estado metabólico no qual um excesso de gordura é acumulado nos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo branco, músculo e fígado. O desenvolvimento da obesidade tem importantes consequências sobre a vida dos indivíduos afetados, causando desde sintomas fisiológicos discretos até sérias morbidades que podem comprometer a qualidade e a expectativa de vida (Horvatz, 2005). A obesidade é o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças como diabetes mellitus do tipo 2, doenças coronarianas, acidente vascular cerebral e alguns tipos de câncer como o de mama e o de cólon (Marx, 2003). Além destes problemas, a obesidade está associada a complicações respiratórias como apnéia do sono e à osteoartrose de grandes e pequenas articulações (Kopelman, 2000).

A obesidade é resultante da combinação de fatores como susceptibilidade genética, aumento da disponibilidade e do consumo de alimentos calóricos, diminuição da prática de atividade física, e inúmeros fatores de ordem psicossocial. Clinicamente, a obesidade é classificada pela Organização Mundial da Saúde segundo o índice de massa corporal (IMC), obtido pela divisão da massa corpórea (em kilogramas) pelo quadrado da altura (em metros). Apresentando tal índice valor acima de 25 é considerado obesidade grau 1 (sobrepeso), acima de 30 obesidade grau 2 (obesidade), e, acima de 40 obesidade grau 3 (obesidade mórbida) (Kopelman, 2000).

Estimativas recentes mostram que a obesidade é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como um dos dez problemas de saúde pública mais importantes da atualidade (Kelner, 2003). Na Europa, 15% dos homens e 22% das mulheres são obesos, enquanto metade da população entre 35 e 65 anos são obesos ou apresentam sobrepeso. Nos Estados Unidos dados colhidos entre os anos de 1988 e 1994 mostram que 20% dos homens e 25% das mulheres estão obesos (Kopelman, 2000). Aproximadamente trezentas mil pessoas morrem devido às desordens relacionadas à obesidade todo ano nos Estados Unidos (Marx, 2003). Esse fenômeno epidemiológico vem ocorrendo em paralelo aos esforços empenhados em identificar os principais fatores predisponentes. Assim, a compreensão dos diversos mecanismos relacionados ao controle da fome e do gasto energético na forma de termogênese deve contribuir para que se obtenham avanços na profilaxia e terapêutica dessa doença (Flier, 2004).

No Brasil os dados não são muito diferentes. A série de estudos realizados pelo *Japanese-Brazilian Diabetes Study Group* com a população nipo-brasileira da cidade de Bauru no Estado de São Paulo revela que modificações de um hábito secular de alimentação aliadas a determinantes genéticos promovem ganho de peso em uma parcela considerável da população estudada, e que abordagens terapêuticas comportamentais não são suficientes para conter o avanço inexorável desta doença (Costa, 2000). Assim, deve se supor que, numa escala global, em não se introduzindo novas modalidades terapêuticas mais específicas e efetivas, aumentos substanciais da prevalência de obesidade devem ocorrer de forma acelerada nas próximas décadas em várias, senão todas, as regiões do planeta.

A ingestão alimentar e o gasto energético são controlados de forma coordenada por neurônios especializados do hipotálamo, que são informados sobre os estoques de energia periférica através dos níveis de leptina e insulina (Flier 2004, Plum 2005, Schwartz 2000, Spiegelman & Flier 2001). Sabe-se ainda que parte do controle predominante exercido por esses hormônios sofre regulação através da ação de outros hormônios produzidos pelo trato digestório, tais como, ghrelina, PYY e CCK, os quais atuam no controle da fome e da massa corporal através de mecanismos complexos de regulação hipotalâmica (Marx, 2003).

Como resultado das ações da insulina e da leptina sobre os neurônios localizados no núcleo arqueado, controla-se a produção dos neurotransmissores anorexigênicos/pro-termogênicos: proopiomelocortina (POMC) e transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART); além dos neurotransmissores orexigênicos/anti-termogênicos: neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao agouti (AGRP) (Horvath 2005, Schwartz 2000).

A insulina é um hormônio produzido pela célula β pancreática, sendo o maior responsável pelo controle metabólico entre o estado de jejum e o estado alimentado (Flier, 2004). A insulina foi o primeiro sinalizador hormonal com ação no sistema nervoso central (SNC) implicado no controle do peso corporal, a ser identificado (Schwartz, 2000). Através de estudos realizados principalmente nos últimos seis anos, tornou-se claro que a insulina exerce efeitos importantes no SNC, onde regula processos como a homeostase

energética, a endocrinologia reprodutiva e a sobrevivência neuronal. Uma vez no hipotálamo, a insulina ativa uma série de vias de sinalização que culminam com a regulação da fome e da termogênese, sendo que, neurônios do núcleo arqueado atuam como porta de entrada para esse sinal (Plum, 2005).

A administração de insulina diretamente no hipotálamo produz um efeito anorexigênico, ou seja, inibe a ingestão de alimentos, resultando desta forma na perda de peso corporal. Ao contrário, a ausência de insulina no cérebro, produz um efeito orexigênico que aumenta a ingestão alimentar, podendo resultar em ganho de peso (Carvalho, 2003 e Bruning, 2000). Insulina administrada por via intracerebroventricular (ICV) reduz a expressão do neuropeptídeo Y, enquanto aumenta a expressão do peptídeo anorexigênico derivando de POMC, hormônio estimulante do melanócito (MSH), revelando que os efeitos anorexigênicos da insulina no SNC estão associados com mudanças na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos (Plum, 2005).

A leptina, um hormônio produzido pelo tecido adiposo, regula a atividade dos neurônios hipotalâmicos, uma vez que converge estímulos aferentes, oriundos da periferia, relacionados à energia estocada na forma de gordura, para o cérebro (Wang Xu, 2005). A administração ICV de leptina também promove redução da ingestão de alimentos. Estudos mostram que camundongos *ob/ob* (incapazes de produzir leptina por defeito genético recessivo) desenvolvem comportamento hiperfágico e obesidade; camundongos *db/db* (portadores de defeito genético recessivo do receptor de leptina) desenvolvem obesidade e diabetes; enquanto animais com *knockout* do receptor de leptina (*Obr*) são obesos e hipertensos (Friedman, 1998).

De acordo com uma série de estudos recentes, a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase) apresenta uma função central atuando como mediadora dos sinais anorexigênicos da insulina e leptina nos neurônios POMC e CART atuando como elo no *cross-talk* neuronal entre a sinalização destes hormônios (Carvalho 2003, Carvalho 2005, Niswender 2003, Xu 2005).

Na via clássica de sinalização da insulina, a PI3-quinase é ativada em seguida à ativação de seu receptor (IR), do recrutamento dos substratos 1 (IRS1) e 2 (IRS2) (Folli 1992 e Velloso 1996) do IR. A PI3-quinase apresenta uma função importante em

numerosos processos biológicos, incluindo sobrevivência celular, migração, atividade metabólica, proliferação, e diferenciação, sendo que para todos esses efeitos, a geração de um segundo mensageiro de membrana é necessária. A geração de tal mensageiro depende da atividade catalítica da enzima utilizando como substrato fosfoinosítois (PI) de membrana. Uma vez ativada, a PI3-quinase catalisa a incorporação de fosfato na posição 3' de PIs, podendo gerar PI3,4P2 ou PI3,4,5P3. Estes PIs fosforilados servem como sítios de ligação para proteínas que conduzem o sinal cascata-abaxo, sendo estas as proteínas PDK e AKT (Cantley 2002).

O sinal intracelular gerado pela formação de PI3,4P2 ou PI3,4,5P3 é interrompido pela atividade de enzimas com atividade inositol fosfatase. Como a afinidade da PDK e da AKT (através de seus sítios de homologia a plestrina) é muito maior pelo PI3,4,5P3 do que pelo PI3,4P2, compreende-se que enzimas com atividade inositol 5-fosfatase desempenham a mais importante função no controle da sinalização através de PI3-quinase (Bertelli 2003, Sly 2003).

As inositol fosfatases SHIP1 e a SHIP2 são os protótipos das inositol 5-fosfatases responsáveis por encerrar a transdução do sinal da insulina através de PI3,4,5P3. A SHIP1 é uma proteína de 145 kDa, expressa predominantemente em células de linhagem hematopoiética, respondendo aos estímulos por citocinas e por fatores de crescimento e participando do controle da apoptose, diferenciação, migração e de granulação celular (Majerus 1999, Sly 2003).

A SHIP2, uma proteína de 150 kDa, contém um domínio SH2 na porção NH₂-terminal, um domínio 5-fosfatase na porção central e um domínio rico em prolina na porção COOH-terminal (Dyson, 2001). É bem caracterizada como um potente regulador negativo da sinalização e da sensibilidade à insulina *in vivo*. Sua presença foi detectada em fibroblastos, miócitos, e em diferentes áreas do cérebro de ratos (Muraille, 1999). Em camundongos, no décimo quinto dia de vida intrauterina, a SHIP2 é expressa em grandes quantidades no fígado, em regiões específicas do sistema nervoso central, no timo e no pulmão. Já em camundongos adultos, o mRNA da SHIP2 está presente apenas no cérebro e no timo (Schurmans, 1999).

Camundongos com *knockout* combinado de SHIP2 e também do exon Phox2a (Inpp11 e Phox2a) apresentam aumento da sensibilidade à insulina, caracterizada por hipoglicemia grave. Nesses animais foi observado ainda, expressão alterada dos genes envolvidos no processo de gliconeogênese hepática. Tais animais têm mortalidade precoce, ainda no período perinatal. Em camundongos adultos, portadores da mutação para o gene da SHIP2 em heterozigose, observa-se aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina associado ao aumento da quantidade de transportador de glicose, GLUT4, na membrana plasmática, e ainda, aumento da síntese de glicogênio em músculo esquelético (Clement, 2001).

A SHIP2 responde predominantemente à estimulação por insulina (Majerus 1999, Sly 2003). A ausência exclusiva da expressão de SHIP2, caracterizada pela ablação do gene Inpp11, resulta em camundongos que apresentam níveis de glicose e insulina normais, tolerância normal à insulina e à glicose, e melhora da transdução do sinal da insulina no fígado e no músculo esquelético. Além disso, tais camundongos são resistentes ao ganho de peso, sugerindo que a inibição da SHIP2 pode ter implicações de ordem terapêuticas para minimizar a obesidade induzida por dieta (Sleeman, 2005).

Com base nos dados acima, decidimos avaliar a participação da SHIP2 na sinalização da insulina no hipotálamo, e seus efeitos no controle da ingestão alimentar.

Durante a otimização dos métodos a serem utilizados no estudo, não encontramos quantidade relevantes de SHIP2, nem tampouco de SHIP1, em extratos protéicos de hipotálamo. Entretanto, usando um anticorpo anti-SHIP2, detectamos uma proteína de aproximadamente 70 kDa que era expressa de forma abundante no hipotálamo, e que respondia ao tratamento ICV com insulina, sofrendo fosforilação em tirosina.

Durante a busca por similaridades estruturais e antigênicas entre a SHIP2 e proteínas de 70 kDa encontramos a 5ptase IV, enzima da grande família das inositol polifosfatase 5-fosfatase I-IV, cujo RNAm foi detectado em vários tecidos humanos como cérebro, coração, placenta, pâncreas e testículos, e ainda em ratos nos mesmos tecidos citados anteriormente e mais fígado e rim. Tal enzima apresenta uma afinidade pelo PI3,4,5 P3 dez vezes maior que outras inositol 5-fosfatase que também atuam sobre esse substrato

(Kisseleva, 2000), tornando-se assim uma reguladora potencial de seus níveis dentro da célula (Kisseleva, 2002). O DNAC desta fosfatase codifica uma proteína de 72 kDa com um domínio rico em prolina na porção N-terminal, um domínio 5-fosfatase na porção central e um motivo CAAX na porção C-terminal (Kong, 2000).

A superexpressão da 5ptase IV em linhagem de células 293 rim humano, causa uma rápida depleção nos níveis de PI3,4,5P3 e uma redução na fosforilação da AKT, aumentando a apoptose induzida pela FAS, sugerindo que a 5ptase IV possa atuar como uma reguladora relevante da via PI3K /AKT (Kisseleva, 2002).

Dessa forma, o objetivo desse estudo passou a ser a caracterização da presença e função da enzima 5ptase IV em hipotálamo de ratos.

2- OBJETIVOS

O objetivo inicial desse estudo era avaliar a presença e a função da 5'-inositol fosfatase SHIP2 sobre a ação da insulina em hipotálamo de ratos. Como, durante experimentos iniciais, observamos que esta fosfatase não é expressa em quantidades consideráveis no hipotálamo, mas que anticorpos anti-SHIP2 são capazes de reconhecer outra 5'-inositol fosfatase, a 5ptase IV, o objetivo passou a ser avaliar a presença e a função da 5ptase IV sobre a ação da insulina no hipotálamo de ratos.

3- RESULTADOS

Os resultados desta tese originaram o seguinte trabalho:

**5PTASE IV INHIBITS INOSITIDE TRISPHOSPHATE ACCUMULATION IN
HYPOTHALAMUS AND REGULATES FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT**

Esse trabalho foi:

- Apresentado na forma de Pôster no VII Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo realizado de 04 a 07 de maio de 2006 em Guarujá, SP;
- Publicado pela *Endocrinology*.

5PTASE IV INHIBITS INOSITIDE TRISPHOSPHATE ACCUMULATION IN HYPOTHALAMUS AND REGULATES FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT

Daniela F. Bertelli¹, Eliana P. Araújo¹, Maristela Cesquini¹, Graziela R. Stoppa¹, Miriam Gasparotto-Contessotto², Marcos H. Toyama³, Jorge V. C. Felix⁴, Lisete C. Michelini⁴, Silvana Chiavegatto⁵, Antonio C. Boschero³, Mario J. A. Saad¹, Iscia Lopes-Cendes², Licio A. Velloso¹

Departments of ¹Internal Medicine, ²Medical Genetics and ³Physiology and Biophysics, State University of Campinas, SP, Brazil; Department of ⁴Physiology and Biophysics and ⁵Instituto do Coração (InCor), University of Sao Paulo, SP, Brazil

Address all correspondence to: Licio A. Velloso (lavelloso@fcm.unicamp.br)

DCM – FCM, UNICAMP

13083-970 Campinas SP

Brazil

Summary

The lipid metabolizing enzyme, phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), exerts an important role in the transduction of the anorexigenic and thermogenic signals delivered by insulin and leptin to first-order neurons of the arcuate nucleus in the hypothalamus. The termination of the intracellular signals generated by the activation of PI 3-kinase depends on the coordinated activity of specific inositol phosphatases. Here, we show that phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV (5ptase IV) is highly expressed in neurons of the arcuate and lateral nuclei of the hypothalamus. Upon intracerebroventricular (ICV) treatment with insulin, 5ptase IV undergoes a time-dependent tyrosine phosphorylation, which follows the same patterns of canonical insulin signaling through the insulin receptor, IRS2, and PI 3-kinase. To evaluate the participation of 5ptase IV in insulin action in hypothalamus, we employed a phosphorthioate modified antisense oligonucleotide specific for this enzyme. The treatment of rats with this oligonucleotide for four days reduced the hypothalamic expression of 5ptase IV by ~80%. This was accompanied by a ~70% reduction of insulin-induced tyrosine phosphorylation of 5ptase IV and by an increase in basal accumulation of phosphorylated inositols in the hypothalamus. Finally, inhibition of hypothalamic 5ptase IV expression by the antisense approach resulted in reduced daily food intake, body weight loss and decreased 12 h spontaneous food intake. Thus, 5ptase IV is a powerful regulator of signaling through PI 3-kinase in hypothalamus and may become an interesting target for therapeutics of obesity and related disorders.

Introduction

Food intake and energy expenditure are coordinately controlled by specialized neurons of the hypothalamus that are informed about peripheral energy stores by leptin and insulin (Flier, 2004; Plum et al., 2005; Schwartz et al., 2000; Spiegelman and Flier, 2001). These hormones act in at least two subtypes of first-order neurons localized in the arcuate nucleus, controlling the production of the anorexygenic/pro-thermogenic neurotransmitters, proopiomelanocortin (POMC) and cocaine-and-amphetamine-related transcript (CART), and the orexygenic/anti-thermogenic neurotransmitters, neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (Agrp) (Horvath, 2005; Schwartz et al., 2000). According to a series of recent studies, the lipid metabolizing enzyme, phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), plays a central role as a mediator of both insulin and leptin anorexygenic signals in POMC/CART neurons (Carvalho et al., 2003; Carvalho et al., 2005; Niswender et al., 2003; Xu et al., 2005).

In classical insulin signaling, PI 3-kinase is activated following its recruitment by tyrosine-phosphorylated IRS1/2 (Folli et al., 1992; Velloso et al., 1996). Once activated, PI 3-kinase catalyzes the incorporation of phosphate at the 3' position in membrane-bound phosphoinositides (PIs), generating PI_{3,4}-bisphosphate (PI_{3,4}-P₂) and PI_{3,4,5}-trisphosphate (PI_{3,4,5}-P₃) (Cantley, 2002). These phosphorylated PIs serve as docking sites for downstream signaling proteins such as PDK and Akt, which forward the insulin signal towards distal effectors (Cantley, 2002). The affinity of pleckstrin homology (PH) domain-containing proteins towards PI_{3,4,5}-P₃ is much higher than their affinity towards PI_{3,4}-P₂. As a consequence, inositol 5'-phosphatases (which catalyze the conversion of PI_{3,4,5}-P₃ to PI_{3,4}-P₂) exert the most potent effect in the control of the intracellular signals that are transduced through these intermediates (Bertelli et al., 2003; Sly et al., 2003). SH2-containing inositol 5'-phosphatase-1 and -2 (SHIP1 and SHIP2) are the prototypic inositol 5'-phosphatases responsible for shutting down the signal transduction through PI_{3,4,5}-P₃. SHIP1 is a 145 kDa protein expressed predominantly in cells of the hematopoietic lineage, responding to cytokine and growth factor stimulation and participating in the control of apoptosis, differentiation, migration and degranulation (Majerus et al., 1999; Sly et al., 2003). In addition, the 150 kDa SHIP2 is ubiquitously expressed and responds predominantly to insulin stimuli (Majerus et al., 1999; Sly et al., 2003). The lack of SHIP2

expression leads to improved insulin signal transduction in liver and skeletal muscle (Sleeman et al., 2005). Moreover, combined SHIP2/Phox2a gene disruption leads to severe neonatal hypoglycemia and perinatal death, while heterozygotic disruption of these genes produces a highly insulin-sensitive phenotype (Clement et al., 2001). Since the main phenotypic consequence of exclusive SHIP2 gene deletion is resistance to dietary obesity (Sleeman et al., 2005), we decided to evaluate the participation of SHIP2 in hypothalamic insulin signaling, and its effects on the control of food intake. During the optimization of the methodological approach, we were unable to find substantial SHIP2 (and SHIP1) immunoreactivity in hypothalamic protein extracts. However, using SHIP2 and SHIP1 antibodies, we detected a ~70 kDa protein that was highly expressed in the hypothalamus and responded to intracerebroventricular (ICV) – injected insulin by undergoing tyrosine phosphorylation. Here, we show that the enzyme phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV (5ptase IV) corresponds to the ~70 kDa – SHIP2-cross reactive protein, and that this phosphatase plays a major role in the control of the transduction of the insulin signal towards PI 3-kinase in the hypothalamus of rats.

Results

Detection of an insulin-responsive protein of ~70 kDa in hypothalamus that is cross-reactive with SHIP1 and SHIP2 antibodies. To evaluate the expression and tissue distribution of SHIP2 in the hypothalamus of rats, 5.0 µm sections of paraformaldehyde fixed specimens were employed in double-staining immunohistochemistry, and analyzed by confocal microscopy. As shown in Figure 1A, SHIP2 immunoreactivity was co-localized with the insulin receptor (IR) in neurons of the arcuate and lateral nuclei of the hypothalamus. A similar pattern of staining was obtained when using a SHIP1 specific antibody (Fig. 1B). However, when hypothalamic protein extracts were used in regular immunoblotting experiments with anti-SHIP2 antibodies (Fig. 1C, left-hand blot) only a faint band was observed at ~150 kDa, which was of a much lesser magnitude than the typical SHIP2 immunoreactivity detected in skeletal muscle protein extracts. In addition, the same pattern of a faint ~145 kDa band was observed when blotting SDS-PAGE separated hypothalamic protein extracts with SHIP1 antibodies (Fig. 1C, right-hand blot).

Once more, the band detected in hypothalamic extracts was much fainter than the typical SHIP1 immunoreactivity detected in thymic protein extracts. Interestingly, both SHIP2 and SHIP1 antibodies detected a ~70 kDa protein band in all tissues evaluated (Fig. 1C). To determine if the SHIP2 – immunoreactive ~70 kDa protein would respond to insulin by undergoing tyrosine phosphorylation, Wistar rats were submitted to lateral ventricle ICV cannulation and, after a recovery period, were chased with a single dose of insulin ICV. As shown in Figure 1D, insulin was able to induce the tyrosine phosphorylation of the SHIP2 – immunoreactive ~70 kDa protein following a time-dependent pattern, peaking at 13 minutes and returning to basal level at 30 min.

5ptase IV corresponds to the SHIP2/SHIP1 immunoreactive ~70 kDa protein. Using the BLAST and alignment programs of the NCBI-NIH, we found the ~70 kDa (72 kDa) 5ptase IV protein that shares 30% and 32% identity with SHIP1 and SHIP2, respectively, as depicted in Figure 2A. The alignment of all three proteins revealed that similarities occurred in the middle portions of the mature proteins and were overlapping in 5ptase IV vs. SHIP1 and 5ptase IV vs. SHIP2 alignments (Fig 2A). To confirm whether the high degree of identity between the proteins could explain the cross-reactivity of SHIP1 and SHIP2 antibodies with 5ptase IV, we immunized rabbits with a 5ptase IV – specific peptide and produced a polyclonal antiserum against this phosphatase. As depicted in Figure 2B, the serum from an immunized rabbit recognized a 72 kDa protein that could be depleted by previous sequential immunoprecipitations with SHIP2 and SHIP1 antibodies as well as with the 5ptase IV antibody (Fig. 2C). Differently from the SHIP2 antibody that cross-reacts with 5ptase IV in skeletal muscle (Fig. 2D, lane1) and in hypothalamus (Fig. 2D, lane 5); and from the SHIP1 antibody that cross-reacts with 5ptase IV in thymus (Fig. 2D, lane 2) and hypothalamus (Fig. 2D, lane 6), the 5ptase IV antibody does not recognize bands at ~145-150 kDa in skeletal muscle (Fig. 2D, lane 3), thymus (Fig. 2D, lane 4), and hypothalamus (Fig. 2D, lane 7), suggesting that it lacks cross-reactivity with SHIP2 and SHIP1. The cross-reactivity between the antibodies was further evaluated by double-staining immunohistochemistry and confocal microscopy. Using this method the immunoreactivity for SHIP2 and 5ptase IV and for SHIP1 and 5ptase IV was detected in overlapping cells in the arcuate nucleus (Fig. 2E). Next, using the 5ptase IV antiserum, we

were able to detect the presence of this enzyme in neurons of the arcuate nucleus (Fig. 3A) and lateral hypothalamus (Fig. 3C). Particularly in the arcuate nucleus, but also to a minor degree in the lateral hypothalamus (not shown), 5ptase IV immunoreactivity coincided with the expression of the IR (Fig. 3B). The 5ptase IV immunoreactivity was also detected in neurons of the frontal cortex (Fig. 3D, upper lane), parietal cortex (Fig. 3D, middle lane), and in pyramidal neurons of the cerebellum (Fig. 3D, lower lane). To expand the characterization of the expression of 5ptase IV in the central nervous system, we performed *in situ* hybridization studies that revealed the expression of the transcript of 5ptase IV in the arcuate nucleus and lateral hypothalamus (Fig. 3E and 3F, respectively). In addition, real-time PCR demonstrated the expression of the 5ptase IV transcript in the frontal cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, midbrain and cerebellum (Fig. 3G). The highest expressions were seen in the cerebellum and hypothalamus. Finally, to confirm the expression of 5ptase IV in hypothalamus, we performed PCR cloning, followed by sequencing of a substantial fragment of the mRNA coding for this protein. As depicted in Table 1, the BLASTn alignment of the cDNA fragment obtained by RT-PCR confirms the identity of the protein, which displayed 97% homology with the *Rattus norvegicus* 5ptase IV cDNA sequence, gi |62644778|, available at the GenBank.

5ptase IV undergoes insulin-induced tyrosine phosphorylation. To evaluate whether hypothalamic insulin signaling can promote tyrosine phosphorylation of 5ptase IV, ICV cannulated rats were ICV treated with a standardized dose of insulin (Torsoni et al., 2003) and then used to study some of the canonical steps of the insulin signaling pathway in parallel with 5ptase IV. As shown in Figure 4, insulin was capable of inducing the tyrosine phosphorylation of the IR (Fig. 4A, left-hand upper blot, 2 min) and IRS2 (Fig. 4A, right-hand upper blot, 5 min). Insulin was also capable of promoting the association of IRS2 with the p85 subunit of PI3-kinase (Fig. 4A, left-hand lower blot, 5 min) and the catalytic activation of PI3-kinase (Fig. 4A, right-hand lower image of TLC, 5 min). In addition, ICV insulin was capable of inducing, in a time-dependent fashion, the tyrosine phosphorylation of 5ptase IV without affecting its protein quantity (Fig. 4B). Similarly to the results obtained using the SHIP2 antibody (as in Fig. 1D), insulin-induced tyrosine phosphorylation of 5ptase IV peaked at 13 min and returned to basal levels at 30 min.

According to a similar time-course, insulin-induced tyrosine phosphorylation of 5ptase IV was associated with the molecular interaction of this enzyme with the p85 subunit of PI3-kinase (Fig. 4C, upper blot), IRS2 (Fig. 4C, second blot) and IRS1 (Fig. 4C, third blot), but not with Akt (Fig. 4C, lower blot).

5ptase IV modulates inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus. To evaluate the participation of 5ptase IV in the control of inositide trisphosphate accumulation in the hypothalamus of rats, we designed and tested the efficiency of an antisense phosphorothioate oligonucleotide for its ability to inhibit 5ptase IV expression. As depicted in Figure 4D, the ICV treatment of rats with the 5ptase IV antisense oligonucleotide (AS5ptase), but not with the 5ptase IV sense oligonucleotide (Sen5ptase), was capable of significantly reducing the protein expression of 5ptase IV ($79\pm 13\%$ reduction, $p < 0.05$) without affecting the expression of other proteins that participate in the transduction of the insulin signal, such as IR, IRS2 and p85-PI3-kinase. The effect of the AS5ptase injected through an ICV cannula placed in the lateral ventricle was confined to the hypothalamus, promoting no significant inhibition of 5ptase IV expression in the frontal and parietal cortexes, as well as in the cerebellum (Fig. 4E). Inhibition of 5ptase IV expression significantly reduced the insulin-induced tyrosine phosphorylation of 5ptase IV (Fig. 4F) and, interestingly, it also significantly increased the basal IRS2 – associated catalytic activity of PI3-kinase without affecting its IRS2 – associated, insulin-induced activity towards phosphatidylinositol (Fig. 4G). In addition, we observed that the catalytic activity of 5ptase IV towards $PI_{4,5}\text{-}P_2$ was stimulated, following a similar time-course to its insulin-induced tyrosine phosphorylation (Fig. 4H), suggesting that the tyrosine phosphorylation event plays a role in the control of the functional activity of the enzyme. This catalytic activity was also inhibited by AS5ptase treatment (Fig. 4H). Next, the evaluation of the effect of 5ptase IV expression inhibition upon the levels of inositide trisphosphate in hypothalamic extracts was performed by anion exchange HPLC and Waters HPLC with a refractive index detector. As depicted in Figure 5A, both methods were capable of detecting the standards for $PI_5\text{-}P_1$, $PI_{4,5}\text{-}P_2$, and $PI_{3,4,5}\text{-}P_3$. The treatment with AS5ptase significantly increased the amount of inositide trisphosphate in hypothalamic extracts, a phenomenon that is not reproduced by inhibition of SHIP2 or SHIP1 expression by antisense

oligonucleotides (Fig. 5B). In addition, after insulin treatment, there is an increase in inositide trisphosphate, which is detectable as a peak at approximately 40 min. In hypothalamic extracts from rats treated with AS5ptase, the inositide trisphosphate peak is already present in basal conditions (saline treated) and no further increase is detected following insulin treatment (Fig. 5C).

Inhibition of 5ptase IV expression reduces food ingestion and promotes body weight loss.

To evaluate whether the inhibition of 5ptase IV in hypothalamus modulates some important physiological functions controlled by insulin in the hypothalamus, rats treated ICV for four days with saline, Sen5ptase or AS5ptase, in the presence or not of the PI3-kinase inhibitor LY 294002, were evaluated for food ingestion and body weight variation. Figure 6A shows that the inhibition of 5ptase IV significantly reduced basal 12 h - spontaneous food intake. However, this treatment did not modify 12 h food intake after ICV insulin stimulus, as compared to the control. In all experimental groups, including AS5ptase treated rats, the use of LY 294002 completely inhibited insulin- or AS5ptase-induced inhibition of food intake, suggesting that most of the effect herein described depends on the formation of PI_{3,4,5}-P₃ catalyzed by PI3-kinase. In addition, the treatment of rats with AS5ptase promoted a dramatic fall in mean daily food intake (Fig. 6B), which was accompanied by a significant and progressive reduction in body weight (Fig. 6C). We observed no modification in the behavior of the animals treated with the AS5ptase. The reduction in feeding was not due to an apparent aversive effect and the inhibitory effect of AS5ptase treatment upon mean daily food intake was completely abolished three days after interruption of the treatment.

Discussion

The prime objective of the present study was to evaluate the role played by SHIP2 in the hypothalamic control of food intake and body weight variation. The investigation started with the immunochemical labeling of hypothalamic sections using a commercially available and well-characterized SHIP2 antibody. By doing so, we could detect the presence of SHIP2 (and SHIP1) immunoreactivity in insulin-receptor-expressing neurons of the hypothalamic arcuate and lateral nuclei. The presence of IR in these regions has been

widely studied and its activation is known to contribute to the control of neurotransmitter production, working in parallel with the ObRb, to warrant an optimal regulation of a series of metabolic functions (Carvalho et al., 2003; Havrankova et al., 1978; Plum et al., 2005; Schwartz et al., 2000). However, no published data have, so far, demonstrated the presence of SHIP2 in these anatomical regions. In fact, only two studies have reported the presence of SHIP2 in the central nervous system. Muraille and co-workers (Muraille et al., 1999) found SHIP2 mRNA in germinative layers of the ventricular zone in mouse embryos. This expression undergoes a drastic reduction throughout adulthood, maintaining a predominant localization in the cerebellum, olfactory tubercle and choroid plexus. Kudo and co-workers reported similar findings in the brain of developing and adult rats (Kudo et al., 2000). As such, we were not completely surprised by the fact that only a faint band appeared at 150 kDa in immunoblot studies of rat hypothalamus. However, to investigate whether the labeling observed in the immunohistochemical studies could be due to some cross-reactivity with similar proteins, we performed immunoblot analysis of SDS-PAGE - resolved hypothalamic protein extracts using a SHIP1 - specific antibody. SHIP1 shares 45% identity with SHIP2 and is reported to be expressed predominantly in hematopoietic tissues (Majerus et al., 1999). Once more, our inability to find significant immunoreactivity towards this phosphatase in the hypothalamus was in agreement with the lack of data concerning its presence in the brain.

Of special interest, we observed that in all immunoblot experiments using either SHIP2 or SHIP1 antibodies, a band of ~70kDa could be detected. This protein was later shown to respond to ICV stimulus with insulin by undergoing time-dependent tyrosine phosphorylation. Using the NCBI-NIH engine for the search of similarities between deposited protein sequences, we found the 72 kDa 5ptase IV protein, which shares 32% and 30% similarity with SHIP2 and SHIP1, respectively. A polyclonal antibody against 5ptase IV was produced and the labeling of neurons of the arcuate and lateral hypothalamic nuclei with this antibody, accompanied by the cross-reactivity of 5ptase IV with SHIP2 (and SHIP1) as evidenced by immunodepletion experiments, plus the sequencing of a considerable fragment of 5ptase IV from hypothalamic mRNA, and finally, the detection of 5ptase IV in hypothalamus by *in situ* hybridization and real-time PCR, strongly suggest that this phosphatase corresponds to the SHIP2 cross-reactive protein in the hypothalamus.

A thorough search for gene and overlapping sequences was performed and revealed that SHIP1, SHIP2 and 5ptase IV are encoded by three distinct genes. In *Rattus norvegicus*, SHIP1 (previously referred simply as SHIP) is encoded by a gene localized at 9q35 (gi|1777941| at the GeneBank) that produces a 145 kDa protein expressed mainly in lymphatic and hematopoietic tissues. SHIP2 is encoded by a gene localized at 1q32 (gi|5263146| at the GeneBank), and renders a product of 150 kDa expressed in most mammalian tissues. Finally, 5ptase IV, also known as INPP5e, is encoded by a gene localized at 3p13 (gi|62644778| at the GeneBank). This gene may produce a large protein of approximately 310 kDa and a smaller form of 72 kDa. Kisseleva and coworkers (Kisseleva et al., 2002; Kisseleva et al., 2000), and Kong and coworkers (Kong et al., 2000) have characterized several aspects of the functional activity of the 72 kDa form of 5ptase IV. To our knowledge, no characterization of the expression and activity of the 310 kDa has been published. We have performed longer SDS-PAGE runs to search for the longer form in rat hypothalamic extracts but no specific band could be detected at this molecular weight (not shown). Thus, we believe that only the 72 kDa form is present in central nervous system. In fact, in the study by Kong and colleagues (Kong et al., 2000), high expression of the 72 kDa form of this enzyme was detected in brain and in testis. In the brain, the expression was localized to regions very similar to the ones we report here. Yet, according to Kisseleva and coworkers (Kisseleva et al., 2002; Kisseleva et al., 2000), the mRNA coding for 5ptase IV is detected in tissues such as brain, heart, testis, kidney, pancreas and liver, appearing as three distinct splicing variants of 9.5, 4.9 and, the predominant, 3.6 kb. Conversely, Kong and coworkers reported a mRNA form of 3.9 kb expressed predominantly in testis, but to a minor degree in a number of other tissues (Kong et al., 2000). These mRNAs code for a mature protein of 644 aminoacids ($M_r = 70,023$), which is resolved as a 72 kDa band in SDS-PAGE. At the functional level, 5ptase IV has the highest affinity for $PI_{3,4,5}-P_3$ ($K_m = 0.65$ mM) being up to 10-fold greater than the other known phosphatases targeting this substrate (Kisseleva et al., 2002; Kisseleva et al., 2000).

The phosphatidylinositol signaling system participates in the control of a number of important functions in eukaryotes, ranging from the modulation of intracellular calcium levels to the control of glucose uptake and apoptosis (Rameh and Cantley, 1999). The termination of the signal transduction through this system depends, largely, on the activity

of specialized inositol phosphatases that are grouped according to their substrate specificity (Majerus et al., 1999). Inositol polyphosphate 5-phosphatases target water-soluble and membrane-anchored inositol phosphates and are sub-classified as groups I-IV for an overview of the system see (Majerus et al., 1999). SHIP1 and SHIP2 belong to the group III inositol 5-phosphatases as they hydrolyze water-soluble $I_{1,3,4,5}\text{-P}_4$ and lipidic $PI_{3,4,5}\text{-P}_3$, whereas 5ptase IV is, for the time being, the sole component of the group IV inositol 5-phosphatase, characterized by its property of targeting $PI_{3,4,5}\text{-P}_3$ and forming a complex with PI 3-kinase (Majerus et al., 1999).

To pursue our initial objective, we decided to evaluate whether 5ptase IV would participate somehow, in the regulation of PI3-kinase dependent signaling in hypothalamus. First, we confirmed that this enzyme responds to insulin stimulus by undergoing tyrosine phosphorylation within a time frame that follows classic insulin signal transduction through IRS2 and PI3-kinase (Saltiel and Kahn, 2001). Insulin is known to induce the tyrosine phosphorylation of SHIP2 in other tissues, but the role of this post-translational modification in SHIP2 function is not completely elucidated (Bertelli et al., 2003; Gagnon et al., 2003; Giuriato et al., 2002; Wisniewski et al., 1999). Next, we observed that, in parallel to the phenomenon of insulin-induced tyrosine phosphorylation, 5ptase IV transiently associates with p85 PI3-kinase, IRS2 and to a minor degree with IRS1. In addition, following a similar time course, the catalytic activity of the enzyme towards 5' phosphorylated phosphatidylinositols is stimulated.

Next, we used an antisense oligonucleotide to inhibit 5ptase IV expression exclusively in hypothalamus. The treatment with the oligonucleotide significantly reduced the expression of the target protein without affecting the expression of other proteins of the insulin signaling pathway. Reduction of 5ptase IV expression was accompanied by a reduced insulin-dependent tyrosine phosphorylation of this protein and by an increase in basal activity, but not insulin-induced IRS2 – associated PI3-kinase activity. Moreover, the inhibition of 5ptase IV expression resulted in increased basal, but not insulin-induced, accumulation of inositide trisphosphate in hypothalamus. Since inositol phosphatases control the accumulation of a product that is down-stream from PI3-kinase, it is not clear why the inhibition of such an enzyme should result in an increased activity of the kinase. One possible explanation is that the binding of 5ptase IV to PI3-kinase, as demonstrated by

Majerus (Majerus et al., 1999), which was confirmed in our studies, could provide an intrinsic mechanism for the control of signal transduction through this system.

In the final part of the study, we evaluated the role of 5ptase IV in two important physiological phenomena controlled by PI3-kinase signaling in hypothalamus, i.e., food intake and variation of body weight (Carvalheira et al., 2003; Niswender et al., 2003; Schwartz et al., 2000). Inhibition of the phosphatase expression reduced spontaneous, but not insulin-inhibited 12 h food intake. The acute ICV injection of insulin is known to promote an up to 50% reduction in 12 h food intake (Torsoni et al., 2003). This event is largely dependent on PI3-kinase since the inhibition of this system has a profound effect on the anorexigenic properties of insulin (Carvalheira et al., 2003; Niswender et al., 2003). The fact that the inhibition of 5ptase IV expression affected only basal and not insulin-inhibited food intake seems to be in keeping with the effect of this treatment only upon basal (and not upon insulin-stimulated) PI3-kinase activity and basal accumulation of inositide trisphosphate in hypothalamus. Thus, it seems logical to suggest that the amount of inositide trisphosphate in the hypothalamus plays a direct role in the control of food intake and that the means used to inhibit inositide trisphosphate depletion are sufficient to match the total effect obtained by insulin treatment to promote the production of this signaling intermediary. This hypothesis is further confirmed by the effect of a longer (10 days) period of ICV treatment in rats with the 5ptase IV antisense oligonucleotide. This treatment resulted in a marked reduction in daily food intake and a parallel reduction in body weight.

Although we have explored only the effects of insulin upon this signaling system, we acknowledge that leptin is also known to employ the PI3-kinase signaling pathway to control food intake. However, in a series of recent studies that reinforced the role of the hypothalamic IRS (particularly IRS2)/PI3-kinase system in the control of food intake and body weight (Carvalheira et al., 2005; Choudhury et al., 2005; Kubota et al., 2004; Lin et al., 2004; Xu et al., 2005), it was shown that, similarly to the JAK2/STAT3 signaling pathway, PI3-kinase is a point of convergence between the insulin and leptin signaling systems in the hypothalamus. The effects of these hormones upon both these pathways are rather specific. Leptin exerts its effects predominantly through the JAK2/STAT3 system and the effect of insulin upon this pathway modulates leptin activity (Carvalheira et al., 2005; Niswender et al., 2003). Conversely, hypothalamic signaling through PI3-kinase is

predominantly controlled by insulin signaling, with leptin exerting a modulatory role upon this pathway (Choudhury et al., 2005; Kubota et al., 2004; Lin et al., 2004; Xu et al., 2005). Thus, we believe that 5ptase IV may act upon signals delivered by both insulin and leptin. However, its importance predominates in the former rather than the later. Further studies will be required to confirm this idea.

In conclusion, we have identified an inositide phosphatase that plays an important role in inositide trisphosphate accumulation in the hypothalamus. A scheme presented in Figure 7, shows our hypothesis regarding the participation of 5ptase IV in the transduction of the insulin signal in hypothalamus. This phosphatase seems to play, in the hypothalamus, a similar role to that played by SHIP2 in peripheral tissues, i. e. as an off-switch for the insulin signal transduction through PI3-kinase. Moreover, our results confirm the absent or minimal expression of SHIP2 in hypothalamus, and provide further evidence (in addition to SHIP1 and SHIP2) for the existence of tissue specific systems for the control of inositide triphosphate signaling. Due to the remarkable effect of 5ptase IV upon spontaneous food intake and body weight, this molecule may become an interesting target for drug therapy for obesity and related diseases.

Experimental Procedures

Antibodies, chemicals and buffers. Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, bovine serum albumin (fraction V) and LY 294002 were from Sigma (St. Luis, MO, USA). Protein A-Sepharose 6MB was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), ¹²⁵I-protein A was from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA), and nitrocellulose paper (BA85, 0.2 µm) was from Amersham (Aylesbury, UK). Sodium thiopental (Amytal) and human recombinant insulin (Humulin R) were from Lilly (Indianapolis, IN, USA). Anti-IR (sc-711, rabbit polyclonal and sc-31367, mouse monoclonal), IRS2 (sc-8299, rabbit polyclonal), p85-PI 3-kinase (sc-423, rabbit polyclonal), SHIP1 (sc-6244, rabbit polyclonal and sc-1964, goat polyclonal), SHIP2 (sc-14504, goat polyclonal) and phosphotyrosine (sc-508, mouse monoclonal) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz,

CA, USA). Anti-NeuN antibody (mouse monoclonal, MAB377) was purchased from Chemicon International (Temecula, CA, USA). Phosphatidylinositol (PI), PIP₁ and PIP₂ were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). PIP₃ and thin-layer-chromatography (TLC) silica plates were from Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). PI_{4,5}P₂ [inositol-2-³H(N)] was from Perkin Elmer (Boston, MA, USA). TRIzol reagent and SuperScript III were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), DNAase was from Promega (Madison, WI, USA), and SYBR Green PCR Master Mix was from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Phosphorothioate-modified oligonucleotides. Sense and antisense phosphorothioate oligonucleotides specific for 5ptase IV [sense (Sen5ptase), 5' ATG CTC CAG GGA CAG CT 3' and antisense (AS5ptase), 5' AGC TGT CCC TGG AGC AT 3'], SHIP2 (sense, 5' CTG CGG AGG AGC TGC T 3' and antisense, AGC AGC TCC TCC GCA G 3'), and SHIP1 (sense, 5' GGA ACA TGG GTA ATG CAC CC 3' and antisense 5' GGG TGC ATT ACC CAT GTT CC 3') were produced by Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). All sequences were selected among two unrelated pairs of oligonucleotides on the basis of their ability to inhibit 5ptase IV protein expression, as evaluated by immunoblotting of total protein extracts of hypothalamus utilizing the anti-5ptase IV antibody. The SHIP2 antisense oligonucleotide was thoroughly characterized in a previous study (Bertelli et al., 2003). All the antisense oligonucleotide sequences were submitted to nucleotide-nucleotide BLAST analyses (Altschul et al., 1997) (at www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched only for the *Rattus norvegicus* 5ptase IV coding sequences.

Production of a polyclonal antibody to 5ptase IV. Male New Zealand White rabbits were immunized with a peptide specific for 5ptase IV (N-YVLLSSAAHGVLYM-COOH). The sequence of the peptide was submitted to protein-protein BLAST analysis (at www.ncbi.nlm.nih.gov) and matched for *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* and *Homo sapiens* 5ptase IV aminoacid sequence and with no overlapping with SHIP2 and SHIP1. IgG (100 µg/ml) was affinity purified using the Protein A AffinityPak column from Pierce (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford IL, USA). The specificity of the antibody was evaluated by immunodepletion with the specific peptide.

Experimental animals and research protocols. Eight-week old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the University of Campinas Central Animal Breeding Center were used in the experiments. The rats were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12 h before the experiments. All experiments were conducted in accord with the principles and procedures described by the NIH Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas Ethical Committee. During the initial steps of the study, hypothalami were obtained from non-ICV-cannulated rats. Protein extracts from these hypothalami were employed in regular immunoblot experiments to evaluate the expression of SHIP2 (and SHIP1). In parallel, ICV cannulated rats were treated in time-course experiments with 10^{-6} M insulin and the hypothalami were obtained for immunoprecipitation and immunoblot analysis of IR, IRS2 and SHIP2 tyrosine phosphorylation. Similar experiments were performed to evaluate the time-course of insulin induced tyrosine phosphorylation of 5ptase IV. For the remainder of the experiments the ICV cannulated rats were randomly divided into three groups: *a*, control (Ctr) rats treated with saline (2.0 μ l, two daily doses for four days); *b*, 5ptase IV antisense (AS5ptase) rats treated with 5ptase IV antisense oligonucleotide (2.0 μ l containing 2.0 nmol antisense oligonucleotide, two daily doses for four days); *c*, 5ptase IV sense (Sen5ptase) rats treated with 5ptase IV sense oligonucleotide (2.0 μ l containing 2.0 nmol sense oligonucleotide, two daily doses for four days). Some rats were treated ICV with SHIP2 and SHIP1 sense or antisense oligonucleotides (2.0 μ l containing 2.0 nmol oligonucleotide, two daily doses for four days) for evaluation of inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus. For evaluation of the SHIP2 and SHIP1 oligonucleotide efficiency, some rats were treated for four days with two doses of the sense or antisense oligonucleotides through intraperitoneal injection. At the end of the experimental period, fragments of skeletal muscle or thymus were obtained and used in regular immunoblot experiments, as described elsewhere (Bertelli et al., 2003). All signal transduction experiments were performed on the morning of the fifth day in 12 h-fasted rats. For evaluation of insulin-induced inhibition of spontaneous food intake the chow was withdrawn at 12 h (noon) on the fourth day and the protocol was started at 18 h on the same day [in these experiments some rats from each group were ICV treated with the PI3-kinase inhibitor LY 294002 (2.0 μ l of a solution containing 50 μ mol/l) at 17:30 h. Some

non-ICV-cannulated rats were employed for immunohistochemical analysis of 5ptase IV, SHIP1 and SHIP2 expression in hypothalamus.

ICV cannulation. For the treatment with antisense oligonucleotide, for evaluation of insulin-induced inhibition of food intake, and for evaluation of insulin-signal transduction, rats were stereotaxically instrumented using a Stoelning stereotaxic apparatus, according to a method previously described [Torsoni, 2003 #11]. Coordinates were: anteroposterior, 0.2 mm/lateral, 1.5 mm/depth, 4.0 mm. Cannula efficiency was tested 1 w after cannulation by the evaluation of the drinking response elicited by ICV angiotensin II (Johnson and Epstein, 1975). After the experiments, cannula placement was also evaluated by histology.

Protocol for food ingestion determination. ICV cannulated rats were food deprived for 6 h (from 12 to 18 h) and at 18 h were ICV treated with insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M), or saline (2.0 μ l). Food ingestion was determined over the next 12 h.

PCR cloning and sequencing of 5ptase IV. Five fragments of conserved domains of the *Rattus norvegicus* 5ptase IV cDNA were obtained by RT-PCR using the following primer sequences: 5'-CAT GGA AAT CAG GGT CTG TG-3', 5'-CCG GGT TTC TAG AGT GAT AC-3', 5'-CCC ATG GTT TTC CAG AGT AC-3', 5'-CTC CTC CGG TTC ATT CAG AT-3', 5'-CCC AGC TCT CAT TTC TCA CA-3' 5'-GAA GCC ATT CAA AGG ACG GA-3', 5'-ATC TGG AGG GAA GTC TTC TG-3', 5'-TCA AGA CAC AGT GCA CAC AG-3'. All 5 cDNA fragments were subsequently cloned into a pGEM-T Easy (PROMEGA™) vector, sequenced (using SP6 and T7 primers), and sequence homologies were evaluated by BLASTn (Altschul et al., 1997).

Tissue extraction, immunoblotting and immunoprecipitation. ICV cannulated rats were anesthetized and acutely treated with saline (2.0 μ l) or insulin (10^{-6} M, 2.0 μ l). After 2 min [for insulin receptor (IR)]; 5 min (IRS2 and PI3-kinase); and 13 min (or according to the time-course experiments, as presented in the results section and figures) (for SHIP2 and 5ptase IV), the hypothalami were obtained and immediately homogenized in solubilization

buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9,000 x g in a 70.Ti rotor (Beckman) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 2.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS1, SHIP2 and 5ptase IV at 4°C overnight, followed by SDS/PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-phosphotyrosine, anti-IR, anti-IRS2, anti-p85/PI3 kinase, anti-SHIP2 and anti-5ptase IV. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-IR, -IRS2, -SHIP1, -SHIP2, and -5ptase IV antibodies, as described (Velloso et al., 1993). In immunodepletion experiments, aliquots of hypothalamus total protein extracts containing 0.5 mg protein were used in three consecutive rounds of immunoprecipitation using either anti-SHIP2 or anti-5ptase IV antibodies. At each immunoprecipitation round, a sample of the supernatant was obtained and used in parallel with a sample of total protein extract in SDS-PAGE and immunoblotting analysis employing the anti-5ptase IV antibody.

Real-time quantitative PCR. Rats were anesthetized, decapitated and their frontal cortex, hippocampus, hypothalamus, midbrain, striatum and cerebellum immediately dissected on ice and snap frozen in liquid nitrogen. Frozen samples were immersed in trizol and homogenized for 30 s at maximum speed. Total RNA was isolated according to the manufacturer's guidelines and quantified by a spectrophotometer. The integrity of RNA was verified on ethidium bromide-stained 1% agarose gel, and the fluorescence intensity ratio of 28S/18S rRNA was determined (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA, USA). Only samples that met our criteria of quality (both 260/280nm and 28S/18S >1.8) were included in the experiments. RNA samples were DNase treated at 37°C for 30 min and the enzyme inactivated at 65°C for 10 min. All 36 samples were column purified, and 1.6 µg of total RNA were reverse transcribed at the same time using a master mix containing oligo(dT)

primer and SuperScript III in a final volume of 20 μ L. The following pairs of primers were used to amplify a product of 96 bp corresponding to the 5ptase IV gene of interest (gi|62644778|): sense 5'CGA GGT TCT GGG TCT TCT G 3' and antisense 5'ATT GGG GTG CTG ACT TTG A 3'; a product of 162 bp for the Gapd reference gene (NM_017008) sense 5'ATG GTG AAG GTC GGT GTG 3' and antisense 5' GAA CTT GCC GTG GGT AGA G 3'; a product of 172 bp for the Actb reference gene (NM_031144) sense 5'CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC 3' and antisense 5' GCC ACC AAT CCA CAC AGA 3'; and a product of 101 bp for the Ppia reference gene (NM_017101) sense 5'AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA 3' and antisense 5' CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA 3'. The specificities of the products were confirmed by BLAST analyses and by electrophoresis on an ethidium bromide-stained 3% agarose gel. Real-time PCR analysis of gene expression was carried out in an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification were obtained through 5-point two-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR reaction contained 2.5 ng or 5.0 ng of reverse-transcribed RNA (depending on the gene), 200 nM of each specific primer, SYBR Green PCR Master Mix, and RNase free water to a 20 μ L final volume. cDNA samples from all brain areas were processed at the same time in triplicate for each gene and the negative controls included for each brain area/primer. The PCR conditions were: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 60s, and a melting step (dissociation curve) was performed after each run to further confirm the specificity of the products and the absence of primer dimers. Real-time data were analyzed using Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). The relative expression of 5ptase IV among brain areas was calculated according to a previous study (Vandesompele et al., 2002).

PI 3-kinase activity assay. For IRS2-associated PI 3-kinase activity assays, 5.0 mg of total protein extracts obtained from the hypothalami of rats exposed to specific experimental conditions were handled using a previously described method (Folli et al., 1992; Velloso et al., 1996). Phosphorylated phosphatidylinositol was separated by thin layer chromatography and specific dots were visualized by exposing the TLC plates to RX-films. Dot intensities were quantified by digital densitometry of the developed autoradiographs.

PI_{4,5}P₂ 5-phosphatase assay. For determination of 5ptase IV catalytic activity towards 5' phosphorylated inositol we adapted a previously described method (Matzaris et al., 1994). In short, 5ptase IV was immunoprecipitated from samples (2.0 mg total protein) of hypothalami of ICV cannulated rats treated with saline or with AS5ptase and with or without insulin, as described above. Protein A Sepharose pellets were resuspended in 50 µl solution containing 20 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 200 µg/ml bovine serum albumin, 3.0 mM MgCl₂, 2.0 mM cetyltriethylammonium bromide, and 250 mM [³H]PI_{4,5}P₂ (3,500 cpm/nmol). Reactions were performed for 30 min at 37 °C and were terminated by the addition of 500 µl of 2.0 M KCl and 200 µl chloroform/methanol (1:1). Products were separated by TLC in chloroform/methanol/acetic acid/H₂O (43:38:4:7). Lipids in TLC plates were visualized by iodine staining and compared to the migration of known standards PI, PI 4P₁, and PI 4,5P₂. Products of the reaction were excised from the TLC plate and quantified by liquid scintillation counting. A hypothalamic protein extract sample treated with no 5ptase IV antibody but only with Protein A Sepharose was used as a control. Results are presented as the percentage of PI_{4,5}P₂/PI 4P₁ obtained in the reaction in the control sample.

Anion exchange HPLC analysis of PIs. The method used for evaluation of PIs has been previously published (Bertelli et al., 2003; Lips and Majerus, 1989; Singh and Jiang, 1995; Woodcock, 1997). In brief, pools of two hypothalami were obtained and homogenized in 1.8 ml of a solution composed of methanol:chloroform:HClO₄ (8%) (20:10:1). After the addition of 500 µl chloroform and 500 µl of 1 % HClO₄, the lower organic phase was collected, washed twice with 1 % HClO₄, and evaporated. Deacylation was performed as described previously (Lips and Majerus, 1989). The deacylation product was resolved on an anion-exchange column (Sodex Ashipak, E8502 N7C) with a gradient of 980 µM (A), 3 M NaH₂PO₄ (B), pH 3.8. The linear gradient rose to 7 % over 30 min, and a 1 min step to 15 % followed by a linear gradient to 30 % B at 60 min, followed by a linear gradient to 60 % B at 80 min. Finally, buffer B was increased to 100 % over 5 min. Highly purified non-phosphorylated PI, PI 5P₁, PI 4,5P₂ and PI 3,4,5P₃ were used as standard controls.

Waters HPLC with Refractive Index Detector. Analysis was performed as previously described, with minor modifications (He et al., 2001). Shortly, samples prepared as stated above under *Anion exchange HPLC analysis of PIs* and the standards PI, PI₅P₁, PI_{4,5}P₂ and PI_{3,4,5}P₃ were analyzed using a Waters HPLC with refractive index detector composed of 515 HPLC pumps, a Millennium chromatographic management and refractive index 2414 with a refractive index detector (Waters Corp., Milford, MA, USA). The reverse phase column was equilibrated with 0.015 M formic acid solution containing 60 % MeOH and 0.4 % tetrabutylammonium hydroxide, pH 4.3 and the samples (20 µl) were resolved through the column that was heated at 35°C. The refractive indexes were used as arbitrary units for comparative and semi-quantitative analysis.

Confocal microscopy. Paraformaldehyde fixed hypothalami were sectioned (5 µm) and employed in regular single or double immunofluorescence staining using anti-IR (1/20), anti-SHIP2 (1/50), anti-SHIP1 (1/50), Anti-NeuN (1/100) and anti-5ptase IV (1/50) antibodies, according to a previously described protocol (Araujo et al., 2002). Analysis and photo-documentation of results were performed using a Zeiss LSM 510 Laser Confocal Microscope. The anatomical correlations were made according to the landmarks given in a stereotaxic atlas (Paxinos and Watson, 1997).

In situ hybridization. For tissue preparation, naïve rats were deeply anesthetized and, immediately after respiratory arrest, thoracotomy was performed to allow transcardiac perfusion (20 ml/min) with 0.01 M phosphate-buffered saline (150 ml), followed by 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.2, for 60 min. The brain was removed, stored for 4 h in the same solution of paraformaldehyde, and then immersed in fixative solutions with sucrose gradients (20-30 %). Specimens were then stored at -80 °C until processing. Serial sections (20 µm) of the hypothalami were obtained according to the landmarks given in a stereotaxic atlas (Paxinos and Watson, 1997). Experiments were conducted in duplicates: for each rat, slices of two wells were hybridized with antisense and two with sense (negative controls) ³⁵S-oligonucleotides for 5ptase IV. Hybridization experiments were performed as described previously (Martins et al., 2005). Briefly,

oligodeoxynucleotide probes complementary to the rat nucleotide sequence 2121-2141 (NCBI-NIH gi|62644778|), or the respective sense sequence, were labeled with ^{35}S dATP using terminal deoxynucleotidyl transferase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). After removing non-incorporated radioactivity, probes were diluted in hybridization buffer to yield approximately $0.3\text{-}0.5 \times 10^6$ cpm /100 μ . The hybridization reaction was performed in free-floating sections (~12-16/tube) incubated overnight with ^{35}S -probe (~300 μL), followed by high stringency post-hybridization treatment. Slices, mounted on polylysine-covered slides, were submitted to autoradiography (exposition to Kodak NTB-2 liquid emulsion with development 3 weeks later) and counterstained with cresyl violet. Hypothalamic areas were identified by bright field examination. After localizing the target area, dark field pictures (72336 μm^2 window) were obtained at 200 x magnification. Density measurements (arbitrary units, AU) were made on the acquired dark field images (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Background measurements were taken from adjacent areas showing no labeling.

Statistical analysis. Specific protein bands present on the blots or PIP dots on TLC plates were quantified by densitometry. Mean values $\pm$ SEM obtained from densitometric scans were compared utilizing Student's *t*-test for paired samples or by repeat-measures analysis of variance (one-way or two-way ANOVA) followed by *post hoc* analysis of significance (Bonferroni test) when appropriate. For real-time PCR the resulting mean values of 5ptase IV in each brain area were compared using ANOVA followed by Student-Newman-Keuls *pos hoc* test, since they were normally distributed. A $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Acknowledgements. We thank Mr. L. Janeri for technical assistance. The antibody against 5ptase IV was prepared and donated by Imuny Biotechnology (Campinas, Brazil). These studies were funded by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Dr. Nicola Conran for English language editing.

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Araujo, E. P., Amaral, M. E., Souza, C. T., Bordin, S., Ferreira, F., Saad, M. J., Boschero, A. C., Magalhaes, E. C., and Velloso, L. A. (2002). Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531, 437-442.
- Bertelli, D. F., Ueno, M., Amaral, M. E., Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Carvalho, C. R., Saad, M. J., Velloso, L. A., and Boschero, A. C. (2003). Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E679-687.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Carvalho, J. B., Ribeiro, E. B., Araujo, E. P., Guimaraes, R. B., Telles, M. M., Torsoni, M., Gontijo, J. A., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (2003). Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46, 1629-1640.
- Carvalho, J. B., Torsoni, M. A., Ueno, M., Amaral, M. E., Araujo, E. P., Velloso, L. A., Gontijo, J. A., and Saad, M. J. (2005). Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 13, 48-57.
- Choudhury, A. I., Heffron, H., Smith, M. A., Al-Qassab, H., Xu, A. W., Selman, C., Simmgen, M., Clements, M., Claret, M., Maccoll, G., et al. (2005). The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. *J Clin Invest* 115, 940-950.
- Clement, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J. F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., et al. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92-97.
- Flier, J. S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350.

- Folli, F., Saad, M. J., Backer, J. M., and Kahn, C. R. (1992). Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 267, 22171-22177.
- Gagnon, A., Artemenko, Y., Crapper, T., and Sorisky, A. (2003). Regulation of endogenous SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) in 3T3-L1 and human preadipocytes. *J Cell Physiol* 197, 243-250.
- Giuriato, S., Blero, D., Robaye, B., Bruyns, C., Payrastre, B., and Erneux, C. (2002). SHIP2 overexpression strongly reduces the proliferation rate of K562 erythroleukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 106-110.
- Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272, 827-829.
- He, J., Cheung, A. P., Wang, E., Fang, K., and Liu, P. (2001). High-performance liquid chromatographic analysis for a non-chromophore-containing phosphatidyl inositol analog, 1-((1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero)phospho)-1D-3-deoxy-myo-inositol, using indirect UV detection. *J Chromatogr A* 913, 355-363.
- Horvath, T. L. (2005). The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 8, 561-565.
- Johnson, A. K., and Epstein, A. N. (1975). The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 86, 399-418.
- Kisseleva, M. V., Cao, L., and Majerus, P. W. (2002). Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits Akt/protein kinase B phosphorylation and leads to apoptotic cell death. *J Biol Chem* 277, 6266-6272.
- Kisseleva, M. V., Wilson, M. P., and Majerus, P. W. (2000). The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* 275, 20110-20116.
- Kong, A. M., Speed, C. J., O'Malley, C. J., Layton, M. J., Meehan, T., Loveland, K. L., Cheema, S., Ooms, L. M., and Mitchell, C. A. (2000). Cloning and characterization of a 72-kDa inositol-polyphosphate 5-phosphatase localized to the Golgi network. *J Biol Chem* 275, 24052-24064.

- Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., Kubota, T., et al. (2004). Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest* 114, 917-927.
- Kudo, M., Saito, S., Owada, Y., Suzaki, H., and Kondo, H. (2000). Localization of mRNA for SHIP2, SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, in the brain of developing and mature rats. *Brain Res Mol Brain Res* 75, 172-177.
- Lin, X., Taguchi, A., Park, S., Kushner, J. A., Li, F., Li, Y., and White, M. F. (2004). Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 114, 908-916.
- Lips, D. L., and Majerus, P. W. (1989). The discovery of a 3-phosphomonoesterase that hydrolyzes phosphatidylinositol 3-phosphate in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 264, 19911-19915.
- Majerus, P. W., Kisseleva, M. V., and Norris, F. A. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem* 274, 10669-10672.
- Martins, A. S., Crescenzi, A., Stern, J. E., Bordin, S., and Michelini, L. C. (2005). Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension* 46, 1004-1009.
- Matzaris, M., Jackson, S. P., Laxminarayan, K. M., Speed, C. J., and Mitchell, C. A. (1994). Identification and characterization of the phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphate 5-phosphatase in human platelets. *J Biol Chem* 269, 3397-3402.
- Muraille, E., Pesesse, X., Kuntz, C., and Erneux, C. (1999). Distribution of the src-homology-2-domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP-2 in both non-haemopoietic and haemopoietic cells and possible involvement of SHIP-2 in negative signalling of B-cells. *Biochem J* 342 Pt 3, 697-705.
- Niswender, K. D., Morrison, C. D., Clegg, D. J., Olson, R., Baskin, D. G., Myers, M. G., Jr., Seeley, R. J., and Schwartz, M. W. (2003). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52, 227-231.

- Paxinos, G., and Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates., 4th edn (San Diego, Academic Press).
- Plum, L., Schubert, M., and Bruning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16, 59-65.
- Rameh, L. E., and Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274, 8347-8350.
- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Singh, A. K., and Jiang, Y. (1995). Quantitative chromatographic analysis of inositol phospholipids and related compounds. *J Chromatogr B Biomed Appl* 671, 255-280.
- Sleeman, M. W., Wortley, K. E., Lai, K. M., Gowen, L. C., Kintner, J., Kline, W. O., Garcia, K., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., and Glass, D. J. (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat Med* 11, 199-205.
- Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Buchse, T., and Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31, 1170-1181.
- Spiegelman, B. M., and Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.
- Torsoni, M. A., Carvalheira, J. B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M. A., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2003). Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E216-223.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

- Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J., and Kahn, C. R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12490-12495.
- Velloso, L. A., Kampe, O., Hallberg, A., Christmanson, L., Betsholtz, C., and Karlsson, F. A. (1993). Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 91, 2084-2090.
- Wisniewski, D., Strife, A., Swendeman, S., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Kavanaugh, W. M., Tempst, P., and Clarkson, B. (1999). A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93, 2707-2720.
- Woodcock, E. A. (1997). Analysis of inositol phosphates in heart tissue using anion-exchange high-performance liquid chromatography. *Mol Cell Biochem* 172, 121-127.
- Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S. (2005). PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115, 951-958.

Figures and Table

Table 1. Alignment of the sequences of the 5ptase IV cDNA clone obtained from *Rattus norvegicus* hypothalamus and the 5ptase IV complete codes deposited at the NCBI-NIH GeneBank, gi|62644778|

gi 62644778	TCTGTGCCCCCTTTGCAGAACCAAGACCCT	1860
seq_5ptase IV	TCTGTGCCCCCTTTGCAGAACCAAGACCCT	30

gi 62644778	CCTGGTGCTTCTGAGAACCTTGAGAACCTCCCAAGGTAGGAGAAGAGGAGGCCCTTCCA	1920
seq_5ptase IV	CCTGGTGCTTCTAAGAACCTTGAGAACCTCCCAAGGTAGGAGAAGAGGAGGCCCTTCCA	90

gi 62644778	TTGCAGGCAAGTTCTGGTTATGCGAGTTTGCTGTCCTACCAACCCACTGAATCTTTACAC	1980
seq_5ptase IV	CTGCAGGCAAGTTCTGGCTATGCGAGTTTGCTGTCCTACCAACCCACTGAATCTTTACAC	150

gi 62644778	AATCAACCTGTCCTGATTGCCAGCCTGATCAAAGCTATAATTGGCTCAGCCCATTAAT	2040
seq_5ptase IV	AATCAACCTGTCCTGATTGCCAGCCTGATCAAAGCTATAATTGGCTCAGCCCATTAAT	210

gi 62644778	TTTTCTGTGTCCTTACCGAATCCTAATGAGAAGAATCAGTGCTGGGAGATGCTGTGGTG	2100
seq_5ptase IV	TTTTCTGTGTCCTTACCGAATCCTAATGAGAAGAATCAGTGCTGGGAGATGCTGTGGTG	270

gi 62644778	GGGGAGAAATCCATGGTGAGCACCCGGGCTCTTGGTGCTGACCATGAAGAACATGCTGCC	2160
seq_5ptase IV	GGGGAGAAATCCATGGTGAGCACCCGGGCTCTTGGTGCTGACCATGAAGAACATGCTGCC	330

gi 62644778	TTGTCTGCAATTCAGCCAGTACTGTCACTGGCTCGTCTTGCCTAACAGTGTACCCAG	2220
seq_5ptase IV	TTGTCTGCAATTCAGCCAGTACTGTCACTGGCTCGTCTTGCCTAACAGTGTACCCAG	390

gi 62644778	AACGTGTGCCCTCGAGGTTCTGGGTCTTCTGAAATGATTGCTAGCCAGCCTGCCAGTTGG	2280
seq_5ptase IV	AACGTGTGCCCTCGAGGTTCTGGGTCTTCTGAAATGATTGCTAGCCAGCCTGCCAGTTGG	450

gi 62644778	TTGGTTCAACAGCTGTCCCCTCAGATTCCTCAAAGTCAGCACCCCAATGCAGAGAAGGGT	2340
seq_5ptase IV	TTGGTACAACAGCTGTCCCCTCAGATTCCTCAAAGTCAGCACCCCAATGCAGAGAAGGGT	510

gi 62644778	CCTTCTGAGTTTGTTAATAGCCCTGCTAATGGAAGTGTGATGCTAGCTCCACCTGCAAAC	2400
seq_5ptase IV	CCTTCTGAGTTTGTTAATAGCCCTGATAATGGAAGTGTGATGCCAGCTCCACCTGCAAAC	570

gi 62644778	AGTGCTGTGATACCTAACAGTAATAAGGGGTATCACTCTAGAAACCCGGAA	
2451		
seq_5ptase IV	AGTGCTGTGATACCTAACAGTAATAAGGGGTATCACTCTAGAAACCCGGAA	621

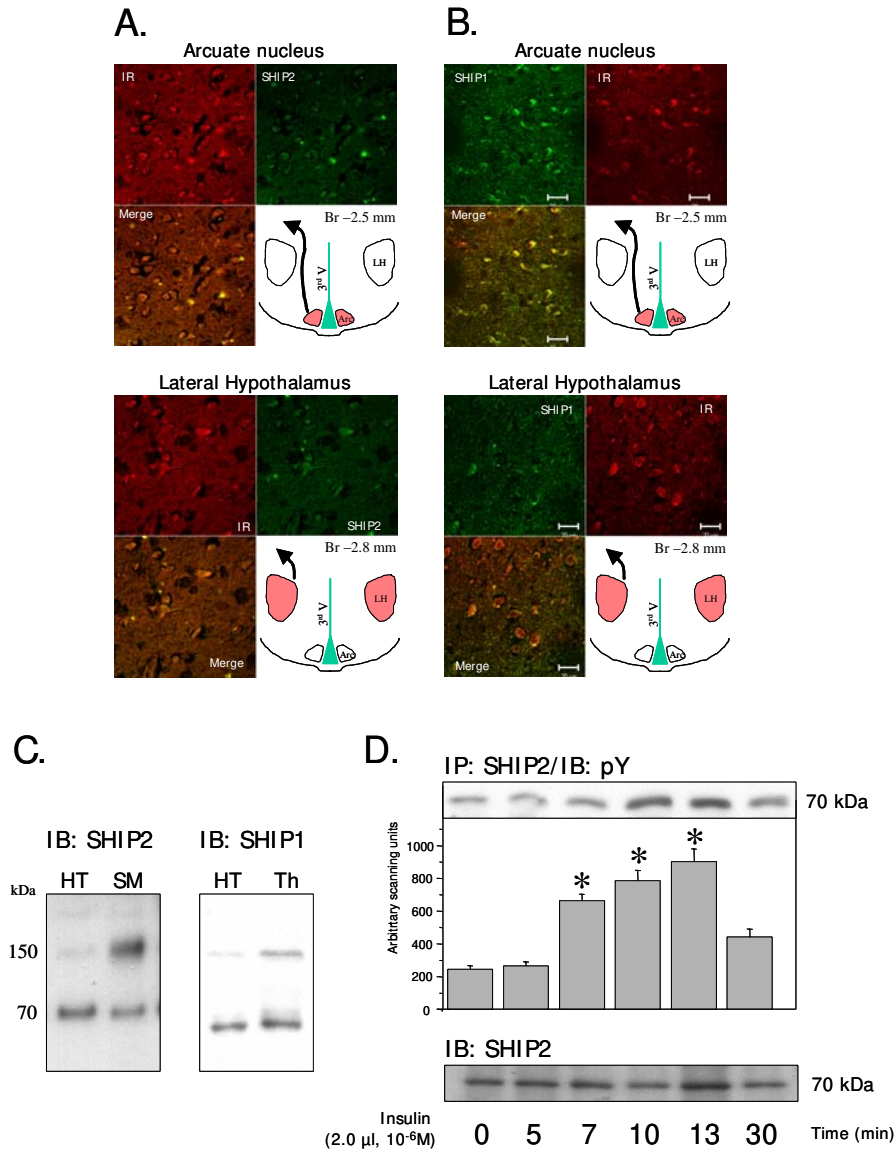


Figure 1. In A and B, 5.0 μ m sections were obtained from the bregma -2.5 mm (Br -2.5 mm) or -2.8 mm (Br -2.8 mm) regions of the hypothalamus of eight-week old Wistar rats (~ 200 - 250 g), according to the parameters of the Paxinos & Watson Atlas for stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1997). The sections were initially incubated with the anti-insulin receptor (IR) antibody (rabbit) and then with the anti-SHIP2 (A) or SHIP1 (B) antibody (goat). Anti-rabbit IgG-rodamine and anti-goat IgG-FITC conjugates were used as secondary antibodies. Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510, Zeiss, New York, NY), always using the same settings for image acquisition. The figures are representative of four independent experiments. Arcuate nucleus (Arc), lateral hypothalamus (LH), third ventricle (3^{rd} V). In C, hypothalamic (HT), skeletal muscle (SM) and thymic (Th) total protein extracts containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-SHIP2 (left-hand blot) or anti-SHIP1 (right-hand blot) antibodies. Molecular mass standards are shown on the left (kDa). Figures are representative of five independent experiments. In D, total hypothalamic protein extracts containing 2.0 mg protein and obtained from ICV cannulated rats were employed in immunoprecipitation (IP) experiments with anti-SHIP2 antibodies. The rats were ICV treated with insulin ($2.0 \mu\text{l}$, 10^{-6} M) and specimens were obtained according to the time course, as depicted in the figure. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phosphotyrosine (pY) antibodies (upper blot). In addition, samples containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE and used in direct immunoblot experiments with anti-SHIP2 antibodies (lower blot). In all experiments, $n = 5$; * $p < 0.05$ vs. saline treated.

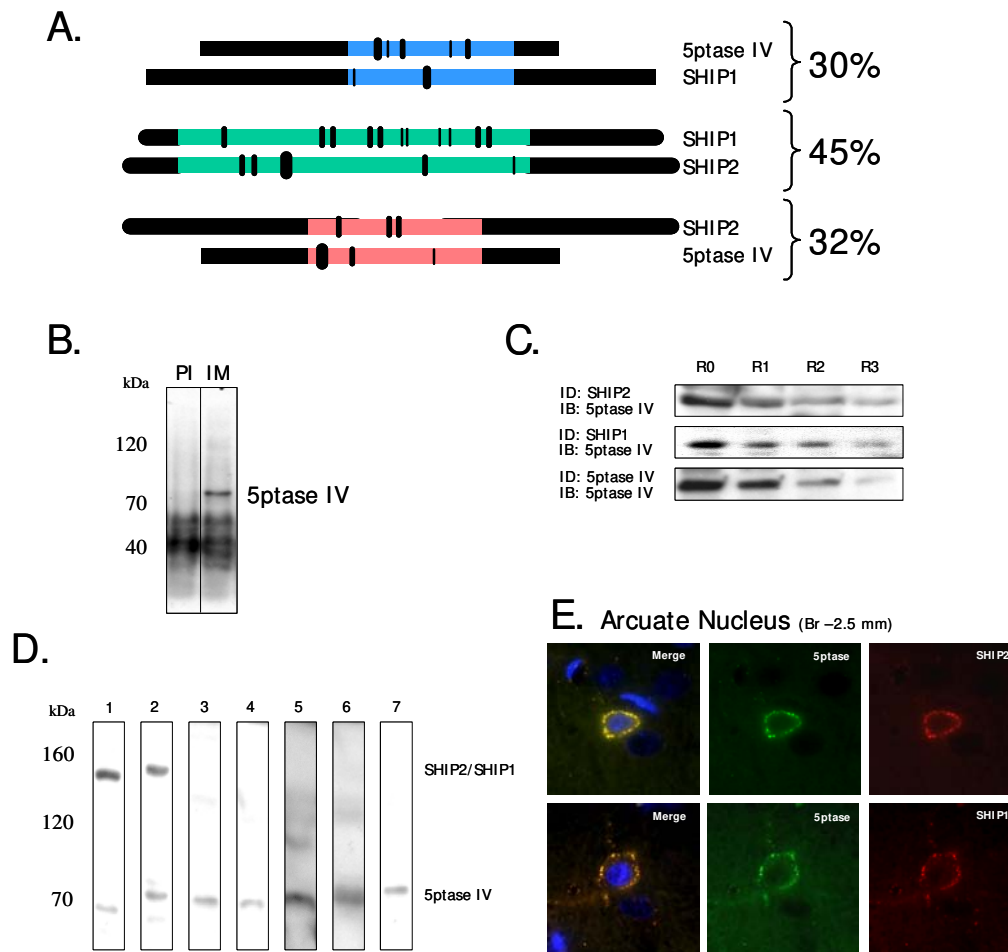


Figure 2. In A, the aminoacid sequences of *Rattus norvegicus* 5ptase IV, SHIP1 and SHIP2 were aligned according to the results obtained with the BLAST and alignment programs of the NCBI-NIH (at www.ncbi.nlm.nih.gov). Colored fragments represent similarities and numbers are representative of identity. In B, rabbits were immunized with a 5ptase IV specific peptide and an affinity-purified antiserum was used in regular immunoblot experiments. Briefly, samples of total protein extracts from hypothalamus containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and the membranes were then cut into strips and blotted with pre-immune (PI) or immunized (IM) antisera. Molecular mass standards are shown on the left (kDa). In C, total protein extracts from hypothalamus were employed in immunodepletion experiments. For this, samples containing 0.5 mg protein were used in three consecutive rounds of immunoprecipitation with anti-SHIP2 (upper blot), anti-SHIP1 (blot in the middle), or anti-5ptase IV (lower blot). Before the first round of immunodepletion and after each consecutive round, a sample from the supernatant was collected (R0 to R3) and separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-5ptase IV. ID indicates the antibody used in the immunodepletion. The figures are representative of five independent experiments. In D, 0.2 mg total protein extracts from skeletal muscle (lanes 1 and 3), thymus (lanes 2 and 4), and hypothalamus (lanes 5-7) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-SHIP2 (lanes, 1 and 5), anti-SHIP1 (lanes, 2 and 6), or anti-5ptase IV (lanes, 3, 4 and 7) antibodies. Molecular mass standards are shown on the left (kDa). Figures are representative of four independent experiments. In E, 5.0 μ m sections were obtained from the bregma -2.5 mm (Br -2.5 mm) region of the hypothalamus of eight-week old Wistar rats (~200-250 g), according to the parameters of the Paxinos & Watson Atlas for stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1997). The sections were incubated with the anti-5ptase IV antibody (rabbit) and then with goat anti-SHIP2 (upper micrographs) or goat anti-SHIP1 (lower micrographs), anti-goat IgG-rodamine and anti-rabbit IgG FITC conjugates were used as secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510, Zeiss, New York, NY) always using the same settings for image acquisition. The figures are representative of four independent experiments.

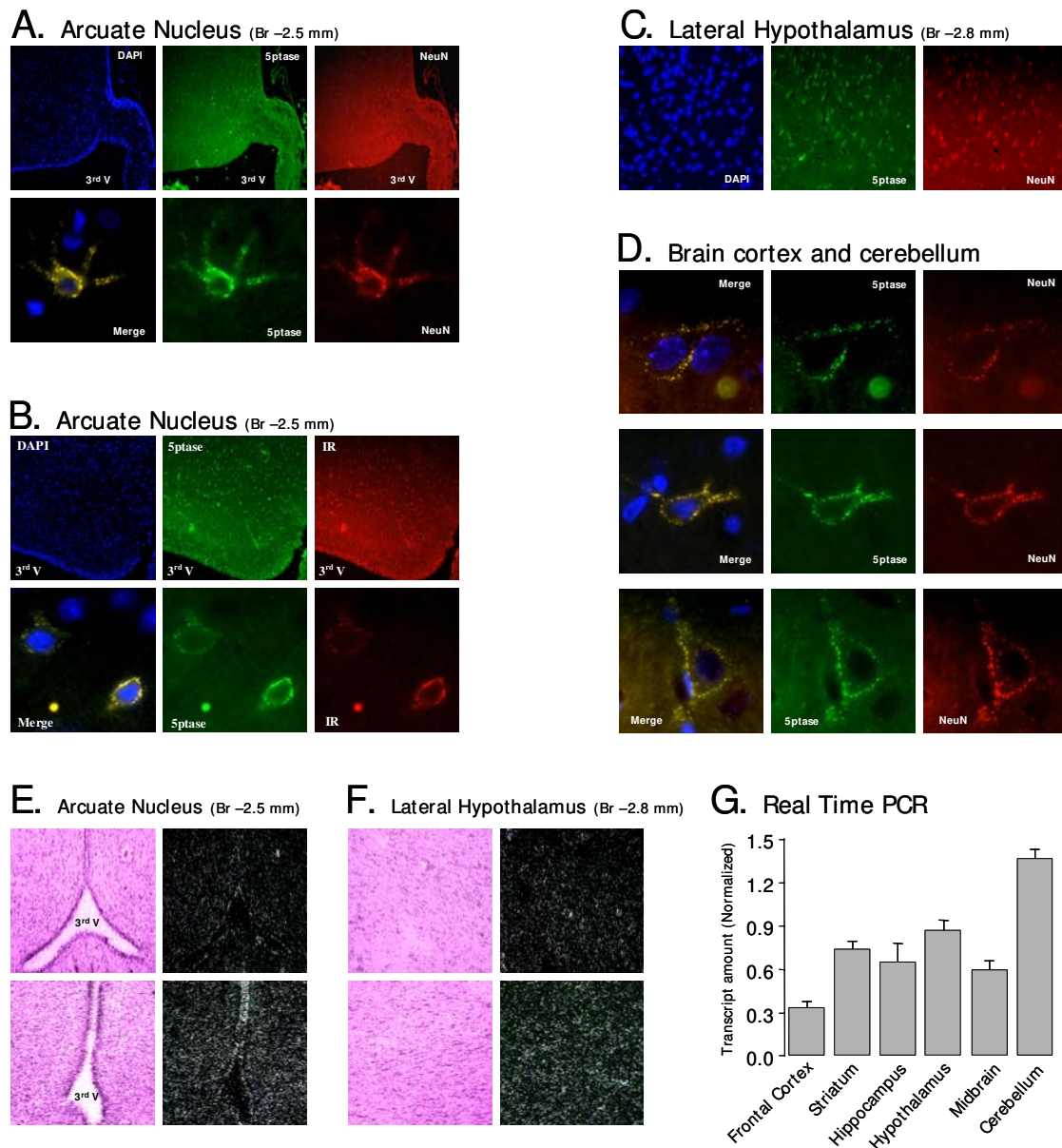


Figure 3. In A-D, 5.0 μ m sections were obtained from the bregma -2.5 mm (Br -2.5 mm) or -2.8 mm (Br-2.8 mm) regions of the hypothalamus of eight-week old Wistar rats (~200-250 g), according to the parameters of the Paxinos & Watson Atlas for stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1997). The sections were initially incubated with the anti-NeuN (A, C and D) (mouse) or with anti-insulin receptor (IR) (B) antibodies (mouse), and then with the anti-5ptase IV (rabbit) antibody. Anti-rabbit IgG-FITC and anti-mouse IgG rodamine conjugates were used as secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI. Images were obtained with a laser confocal microscope (LSM510, Zeiss, New York, NY), always using the same settings for image acquisition. The figures are representative of four independent experiments. Third ventricle (3rd V). In E and F, 20 μ m sections were obtained from the bregma -2.5 mm (Br -2.5 mm) or -2.8 mm (Br-2.8 mm) regions of the hypothalamus of eight-week old Wistar rats (~200-250 g), according to the parameters of the Paxinos & Watson Atlas for stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1997). Sense (upper micrographs) and antisense (lower micrographs) probes were used for *in situ* hybridization as described under Experimental Procedures. Images are representative of four independent experiments. In G, results for real-time PCR are presented as transcript amount per region of the central nervous system. Results are presented as mean $\pm$ SEM; n = 6.

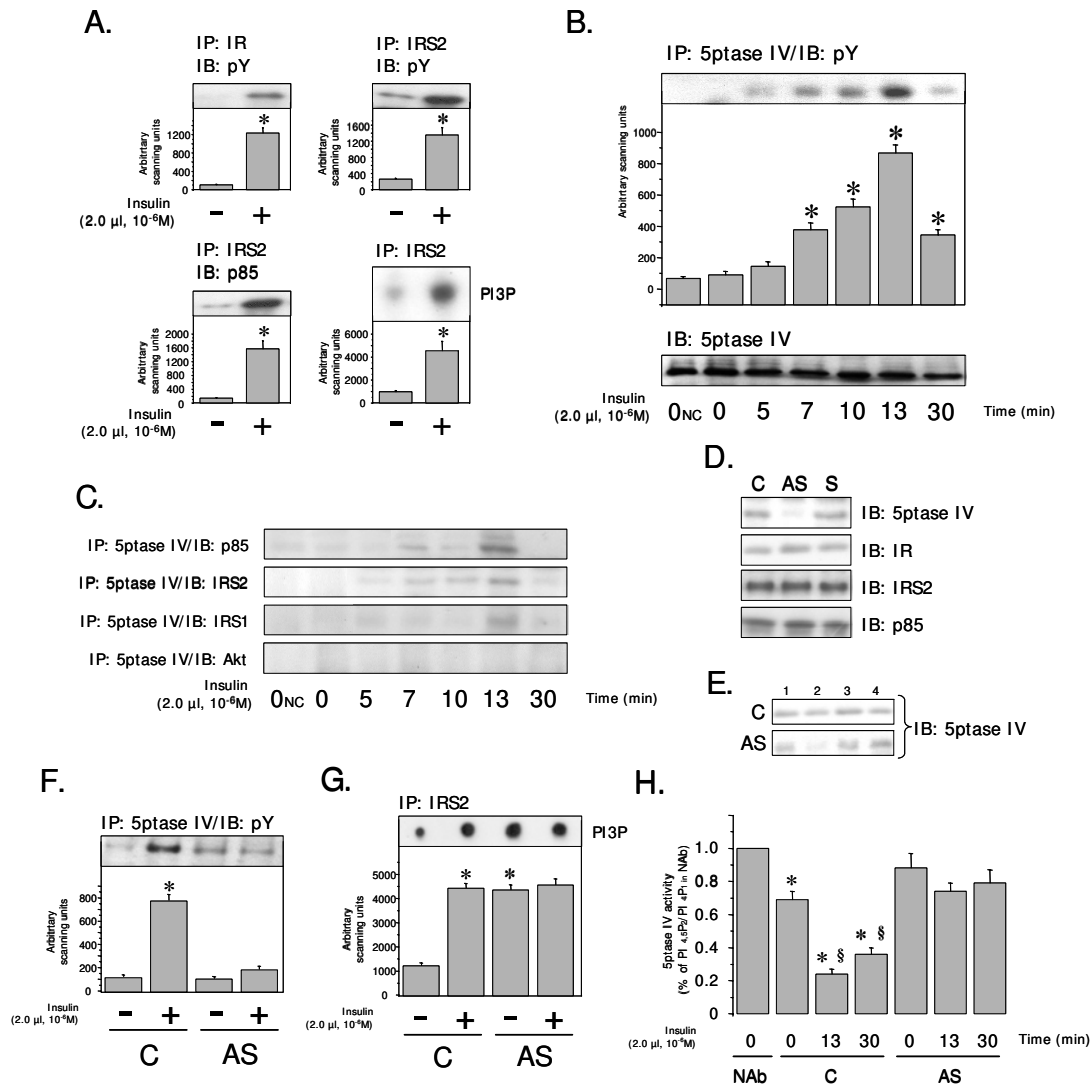


Figure 4. A, ICV-cannulated rats were treated with saline (2.0 μ l) (-) or insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M) (+) and after 2 min [for insulin receptor (IR) immunoprecipitates (IP)] or 5 min (for IRS2 IPs), the hypothalami were obtained for protein extract preparation. Samples containing 2.0 mg (for the two upper blots and for the left-hand lower blot) or 5.0 mg (for the right-hand lower figure) protein were used for immunoprecipitation assays with IR or IRS2 antibodies. For the two upper blots and the left-hand lower blot the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phosphotyrosine (pY) (upper blots) or -phosphatidylinositol 3 kinase (p85) antibodies (left-hand lower blot). For the right-hand lower blot, the IPs were used for the determination of IRS2 – associated phosphatidylinositol 3 kinase activity and resulting phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3P) was resolved by thin-layer chromatography. In B and C, control, non-cannulated (0NC) rats or ICV cannulated rats were treated with saline (2.0 μ l) (0) or insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M) (according to the time course as depicted in the figure) and samples containing 2.0 mg protein from hypothalamic total protein extracts were employed in IP assays with anti-5ptase IV antibodies. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-pY (B, upper blot), anti-p85 PI3-kinase (C, upper blot), anti-IRS2 (C, second blot), anti-IRS1 (C, third blot), or anti-Akt (C, lower blot). In B, the lower blot was obtained from hypothalamic total protein extracts containing 0.2 mg that were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-5ptase IV antibodies. In D-G, ICV cannulated rats were treated with saline (C), with antisense (AS) or with sense (S) oligonucleotides to 5ptase IV for four days and on the morning of the fifth day were ICV treated with saline (2.0 μ l) (-) or insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M) (+). After 5 (D, E and G) or 13 (F) min, hypothalami (D-G; in E, lane 2) and fragments from cerebellum (E, lane 1), frontal cortex (E, lane 3) and parietal cortex (E, lane 4) were obtained for total protein extract preparation. In D and E, samples containing 0.2 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-5ptase IV. In F and G, samples containing 2.0 and 5.0 mg protein, respectively, were used in immunoprecipitation (IP) assays with anti-5ptase IV and IRS2 antibodies, respectively. In F, the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phosphotyrosine (pY) antibody. In G, the IPs were used for the determination of IRS2 – associated phosphatidylinositol 3 kinase activity and resulting phosphatidylinositol 3 phosphates (PI3P) were resolved by thin-layer chromatography. In H, ICV cannulated rats were treated with saline (C) or with antisense (AS) oligonucleotides to 5ptase IV for four days and on the morning of the fifth day were ICV treated with saline (2.0 μ l) (0) or insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M) (according to the time course as depicted in the figure). Samples containing 2.0 mg protein were used in immunoprecipitation assays with anti-5ptase IV antibody. A sample treated with no antibody, but only with Protein A Sepharose served as control (NAb). Immunoprecipitates were used in a 5ptase IV catalytic assay as described under Experimental Procedures. Results are presented as a percentage of PI_{4,5}P₂/PI₄P₁ obtained after the reaction in control (NAb). In all experiments, n = 5; in B, *p<0.05 vs. 0; in F and G, *p<0.05 vs. C (-); in H, *p<0.05 vs. NAb and §p<0.05 vs. C(0).

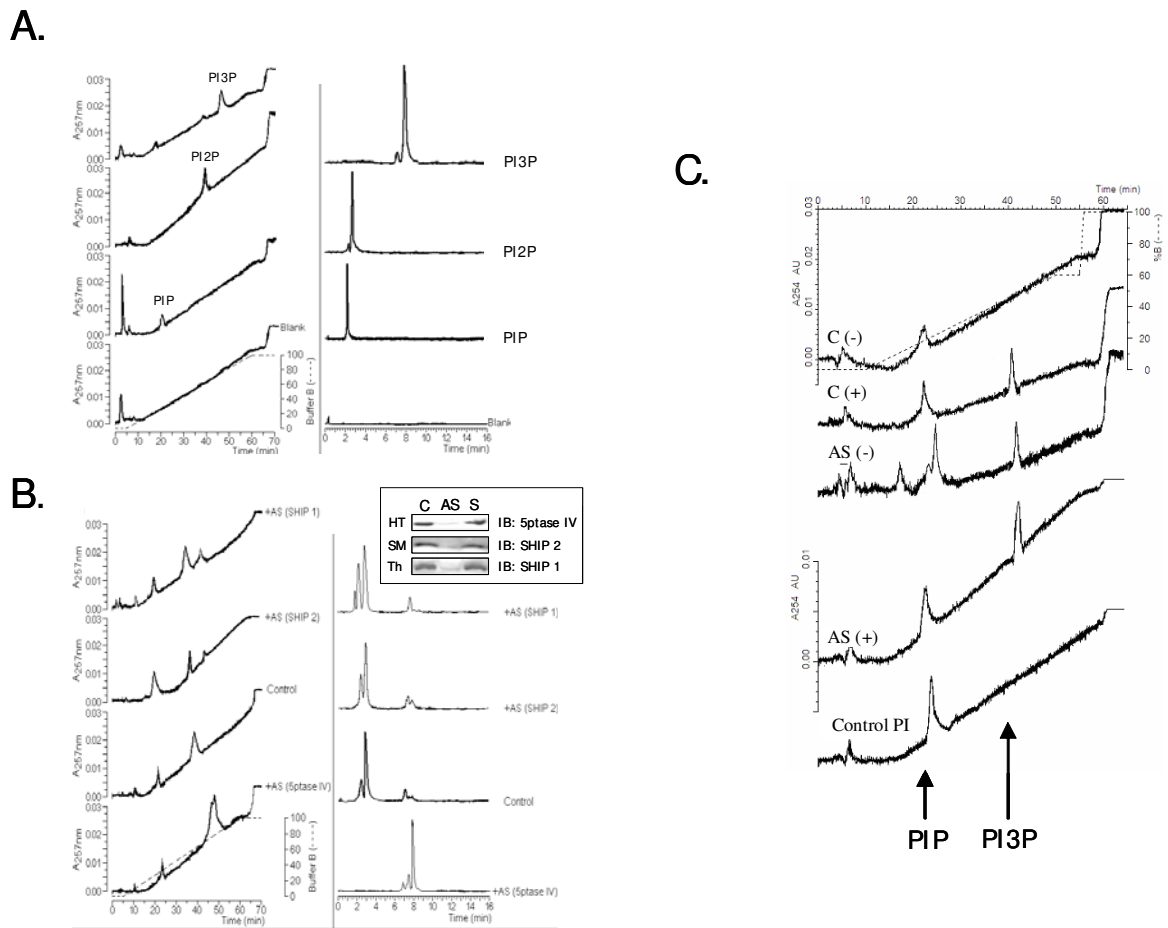


Figure 5. Determination of phosphatidylinositols by anion exchange (A and B, left-hand figures, and C) or by Waters with refractive index detector (A and B, right-hand figures) HPLC. In A, the methods were standardized using highly purified phosphatidylinositols. In B, ICV cannulated rats were treated with saline (control) or with antisense (AS) oligonucleotides to 5ptase IV [+AS (5ptase IV)], SHIP2 [+AS (SHIP2)], or SHIP1 [+AS (SHIP1)] or respective sense (S) oligonucleotides for four days and on the morning of the fifth day hypothalamic lipid fractions were prepared for analysis. In the inset of B, hypothalamic (HT), skeletal muscle (SM) or thymic (Th) protein extracts containing 2.0 mg protein were prepared from rats treated ICV (HT) or via intraperitoneal injection (SM and Th) with the same oligonucleotides as in B. The extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-5ptase IV, anti-SHIP2 and anti-SHIP1 antibodies to evaluate the efficiency of the antisense treatment. In C, ICV cannulated rats were treated with saline (C) or with antisense (AS) oligonucleotides to 5ptase IV for four days and, on the morning of the fifth day, were ICV treated with saline (2.0 μ l) (-) or insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M) (+). After 13 min, lipid fractions were obtained and used for the detection of inositide trisphosphate accumulation by anion exchange HPLC. PI, phosphatidylinositol; PI3P, inositide trisphosphate. Figures are representative of five independent experiments.

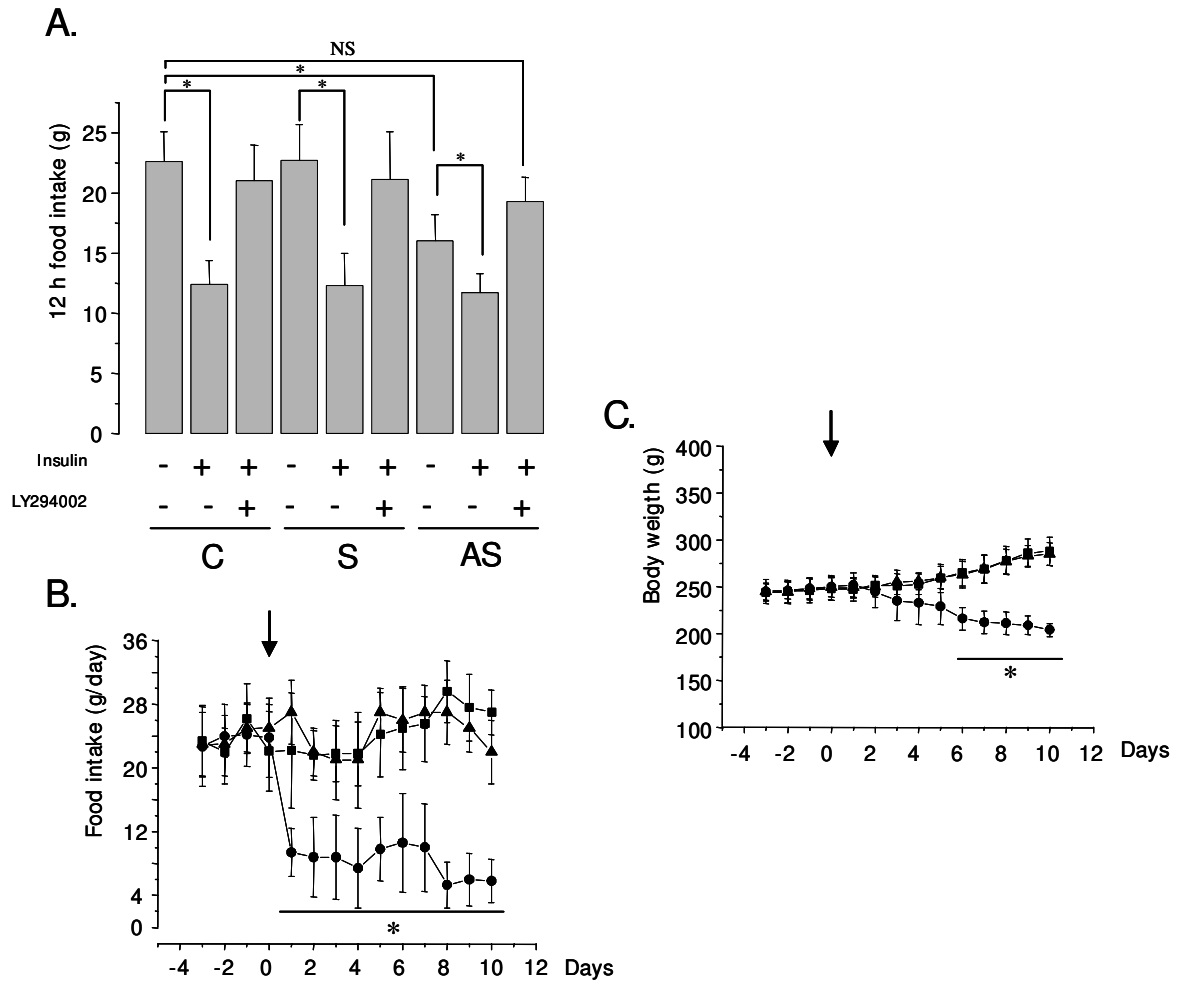


Figure 6. *Inhibition of 5ptase IV expression reduces food intake and promotes loss of body weight.* In A, ICV cannulated rats were treated with saline (C), sense (S) or antisense (AS) oligonucleotide to 5ptase IV for four days. At noon on the fourth day, the chow was withdrawn and at 18 h the rats were treated either with saline (2.0 μ l) (-) or insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M) and chow was re-introduced, some animals were treated with LY 294002 (2.0 μ l, 50 μ mol/l) at 17:30 h. Food intake was determined over the next 12 h. In B and C, ICV cannulated rats were evaluated on a daily basis for 24 h – food intake (B) and body weight (C). After four days of evaluation (indicated by the arrow), ICV treatment with saline (squares), sense (triangles) or antisense (circles) oligonucleotides was started and measurements of food intake and body weight continued until ten days of treatment. For all experiments, n = 5, *p<0.05 vs. saline treated or according to the directions, in A.

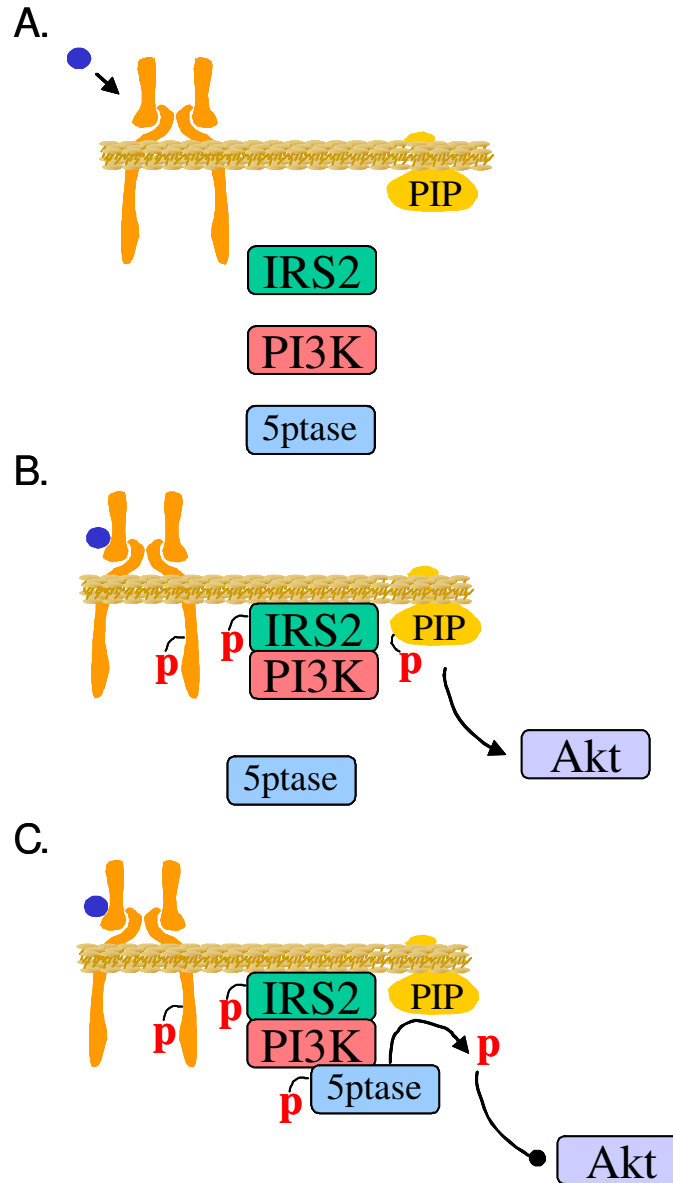


Figure 7. *Proposed scheme for 5ptase IV interaction with the insulin signaling pathway.* In A, before insulin (blue circle) binding to its receptor (IR), low levels of membrane bound phosphatidylinositol phosphorylated at the 3' position coexists with non-complexed IRS2, PI3-kinase and 5ptase IV. In B, after insulin binding to the IR, IRS2 is rapidly tyrosine phosphorylated, recruits and activates the catalytic activity of PI3-kinase towards phosphatidylinositol promoting its 3' phosphorylation and forwarding the insulin signal towards distal effectors, such as Akt. In C, after a short time 5ptase IV is recruited to the IRS2/PI-3-kinase complex and undergoes tyrosine phosphorylation. These events induce its catalytic activity towards phosphatidylinositol phosphorylated at the 3' position interrupting the insulin signal towards distal effectors, such as Akt.

4- DISCUSSÃO

O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar a função exercida pela fosfatase SHIP2 no tecido hipotalâmico, com relação ao controle da ingestão alimentar e da variação do peso corporal.

A investigação iniciou-se através de estudos imunohistoquímicos com secções de hipotálamo usando um anticorpo anti-SHIP2 bem caracterizado. Por meio desse método detectou-se a presença de imuno-reatividade contra SHIP2 em neurônios que expressam receptor de insulina (IR) localizados no núcleo arqueado e lateral do hipotálamo. A presença de IR nesta região foi amplamente estudada e demonstrou-se que sua ativação contribui para o controle da produção de neurotransmissores, que atuam, sob controle paralelo do receptor de leptina (ObRb), levando a uma regulação ótima de uma série de funções metabólicas (Cavalheira et. al., 2003; Havrankova et. al., 1978; Plum et. al., 2005; Schwartz et. al., 2000).

Por outro lado, não existe nenhum dado publicado, até este momento, que demonstre a presença de SHIP2 nestas regiões anatômicas. Na verdade, somente dois estudos reportavam a presença de SHIP2 no sistema nervoso central. Muraille e colaboradores (1999), encontraram RNAm da SHIP2 na camada germinativa da zona ventricular em embriões de camundongos. Na fase adulta, a expressão de RNAm da fosfatase sofreu uma redução drástica mantendo-se localizado predominantemente no cerebelo, tubérculo olfatório e plexo coróide. Kudo e colaboradores (2000), reportaram achados similares no cérebro em desenvolvimento e de ratos adultos. No entanto, não ficamos completamente surpresos pela ausência da banda de 150 KDa, referente à proteína SHIP2, encontrada nos experimentos de imunoblotting com hipotálamo de ratos. Entretanto, ao investigar se a marcação da SHIP2 em hipotálamo, observada nos experimentos de imunohistoquímica, poderia estar relacionada à co-reatividade da SHIP2 com proteínas similares, realizamos análises imunoblotting de SDS-PAGE a partir de extratos utilizando anticorpo contra a também fosfatase SHIP1. A proteína SHIP1 compartilha 45% de identidade com a SHIP2 e está expressa predominantemente em tecido hematopoiético (Majerus, 1999). Mais uma vez, não encontramos imunoreatividade significativa contra essa fosfatase no hipotálamo, o que coincide com a falta de dados consistentes da presença da mesma no cérebro. O mais interessante é que em todos os

experimentos de imunoblotting, usando tanto anticorpo anti-SHIP2 como anti-SHIP1, observamos uma banda de aproximadamente 70 kDa. Esta proteína mostrou resposta à administração de insulina intracerebroventricular (ICV) sofrendo fosforilação em tirosina tempo-dependente.

Através do programa BLAST, do “National Center for Biotechnology Information”, disponível no www.ncbi.nlm.nih.gov, que possibilita pesquisar sobre a similaridade entre seqüências de proteínas, encontramos a 5-phosphatase IV, uma proteína-fosfatase de 72KDa que compartilha 32% e 30% de similaridade com a SHIP2 e SHIP1 respectivamente.

Com base na seqüência da 5ptase IV, um anticorpo policlonal foi produzido. Posteriormente, a análise imunohistoquímica foi realizada através da marcação dos neurônios do núcleo arqueado e núcleo lateral do hipotálamo com tal anticorpo, mostrando a co-reatividade da 5ptase IV com a SHIP2, coincidente com os experimentos de imunodepleção, e ainda a partir da seqüência de um fragmento considerável do RNAm da 5ptase IV, sugerimos que esta fosfatase corresponde á proteína que co-reativa com a proteína SHIP2 no hipotálamo.

O sistema de sinalização da fosfatidilinositol participa do controle inúmeras funções em eucariontes, incluindo modulação do nível de cálcio intracelular no processo de captação de glicose e apoptose (Rameh and Cantley, 1999). A finalização da transdução do sinal através deste sistema depende, em grande escala, da atividade da inositol-fosfatase específica, que são classificadas de acordo com seus substratos específicos (Majerus, 1999).

As fosfatases conhecidas como inositol polifosfatase 5-fosfatase são solúveis em água e possuem inositol-fosfatos ancorados à membrana celular e ainda são classificadas como grupos I – IV (Majerus, 1999). As bem caracterizadas fosfatases SHIP1 e SHIP2 pertencem ao grupo III de inositol 5-fosfatase, uma vez que elas hidrolisam inositóis solúveis em água I1,2,3,4,P4 e inositóis lípidicos PI3,4,5P3, enquanto a 5ptase IV é componente do grupo IV inositol 5-fosfatase, caracterizado pela propriedade de catalizar a reação de formação do PI3,4,5P3 formando um complexo com a PI3-quinase.

Poucos são os trabalhos publicados sobre a 5ptase IV. De acordo com Kisselva (2002) o RNAm desta fosfatase é detectado em tecidos como cérebro, coração, testículos, rim, pâncreas e fígado. O RNAm codifica uma proteína de 644 aminoácidos com peso molecular de 72 kDa. Em relação ao nível funcional, esta proteína tem maior afinidade ao PI3,4,5P3 caracterizando uma afinidade dez vezes maior do que outras fosfatases conhecidas alvo também deste substrato.

Inicialmente, confirmamos que esta enzima responde ao estímulo da insulina sofrendo fosforilação em tirosina, seguindo um padrão de tempo que acompanha a transdução do sinal deste hormônio através do substratos 1 e 2 do receptor da insulina (IRS-1 e -2) e da PI3- quinase (Saltiel e Kahn, 2001).

Sabe-se que a insulina induz a fosforilação em tirosina de SHIP2 em alguns tecidos, mas o papel dessa modificação pós-tradução na função da enzima não está completamente esclarecido (Bertelli, 2003; Gagnon, 2003; Giuriato, 2002; Wisniewski, 1999).

Posteriormente, utilizamos um oligonucleotídeo antisense para inibir a expressão da fosfatase 5ptase IV no hipotálamo. O tratamento com o oligonucleotídeo antisense reduziu significativamente a expressão da proteína-alvo sem afetar a expressão de outras proteínas da via de sinalização da insulina. A redução da expressão da 5ptase IV foi também acompanhada pela redução da fosforilação em tirosina, estimulada pela insulina, desta proteína e por um aumento da sua fosforilação basal, mas não houve redução da atividade da PI3-quinase associada ao IRS-2 induzida pela insulina. Além disso, a inibição da expressão da fosfatase 5ptase IV resultou no aumento da quantidade basal de fosfoinositol fosfato 3 (PIP3), mas não no acúmulo deste fosfoinositol trifosfato no hipotálamo, induzido pela insulina. Uma vez conhecida a função da 5ptase IV no controle da quantidade de PIP3, um dos sinalizadores ativados cascata-abaxio da PI3-quinase, não está claro por que a inibição desta fosfatase resultaria no aumento da atividade da PI3-quinase. Uma possível explicação seria que a ligação da 5ptase IV a PI3-quinase, como demonstrado por Majerus (1999), poderia promover um mecanismo intrínseco para o controle da transdução do sinal.

Para finalizar, avaliamos a função da 5ptase IV em dois importantes fenômenos fisiológicos controlados pela sinalização da PI3-quinase no hipotálamo, a ingestão alimentar e variação do peso corporal (Carvalheira 2003, Niswender 20003, Schwartz 2000).

A inibição da expressão da fosfatase 5ptase IV reduziu a ingestão alimentar espontaneamente, mas não potencializou a ingestão alimentar inibida pela insulina em 12 horas. Sabe-se que a injeção intracerebroventricular de insulina promove a redução de até 50% da ingestão alimentar em 12 horas (Torsoni, 2003). Este evento é dependente da PI3-quinase, uma vez que a inibição deste sistema tem grande efeito sobre as propriedades anorexigênicas da insulina (Carvalheira 2003, Niswender 2003).

O fato da inibição da expressão da 5ptase IV alterar somente a ingestão alimentar basal, e não a ingestão inibida pela insulina, parece estar de acordo com a resposta da atividade da PI3-quinase e também com a quantidade basal de PIP3 no hipotálamo. Assim, parece lógico sugerir que a quantidade de PIP3 no hipotálamo tem uma função direta no controle da ingesta alimentar, e mostrando que a depleção de seus níveis é suficiente para manter o efeito obtido pelo tratamento com insulina. Esta hipótese foi confirmada pelo efeito do tratamento intracerebroventricular, durante um período prolongado, com oligonucleotideo antisense para a fosfatase 5ptase IV. Tal tratamento resultou numa significativa redução da ingestão alimentar diária e na redução paralela da massa corporal.

Em conclusão, identificamos uma fosfatase que apresenta uma função importante no acúmulo de PIP3 no hipotálamo. Tal fosfatase parece ter, neste tecido, uma função similar a fosfatase SHIP2 em tecidos periféricos, uma vez que desliga a transdução do sinal da insulina através da PI3Kinase.

Além disso, nossos resultados confirmam a ausência ou a expressão mínima da SHIP2 no hipotálamo, e fornece maiores evidências da existência de sistemas tecido-específicos para o controle da sinalização do fosfoinositol trifosfato (PIP3).

Devido ao efeito potencial da 5ptase IV sobre a ingestão de alimentos e o peso corporal, o estudo da função desta fosfatase pode torna-se um alvo interessante para o desenvolvimento de drogas visando ação na terapêutica da obesidade e desordens relacionadas.

5- CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

- A enzima 5ptase IV está expressa em neurônios do hipotálamo e em neurônios de algumas outras regiões do sistema nervoso central como cerebelo, núcleo estriado, hipocampo, e córtex frontal;
- O tratamento agudo com insulina por via ICV induz a fosforilação e a ativação catalítica da 5ptase IV em hipotálamo;
- A inibição da expressão da 5ptase IV promove redução da ingestão alimentar e a perda de massa corpórea;
- Portanto, a 5ptase IV participa do controle da ação da insulina no hipotálamo e dessa forma torna-se um alvo interessante para a abordagem terapêutica da obesidade.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Araujo, E. P., Amaral, M. E., Souza, C. T., Bordin, S., Ferreira, F., Saad, M. J., Boschero, A. C., Magalhaes, E. C., and Velloso, L. A. (2002). Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 531, 437-442.
- Bertelli, D. F., Ueno, M., Amaral, M. E., Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Carvalho, C. R., Saad, M. J., Velloso, L. A., and Boschero, A. C. (2003). Reversal of denervation-induced insulin resistance by SHIP2 protein synthesis blockade. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E679-687.
- Bruning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland and Kahn C. R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Carvalho, J. B., Ribeiro, E. B., Araujo, E. P., Guimaraes, R. B., Telles, M. M., Torsoni, M., Gontijo, J. A., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (2003). Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia* 46, 1629-1640.
- Carvalho, J. B., Torsoni, M. A., Ueno, M., Amaral, M. E., Araujo, E. P., Velloso, L. A., Gontijo, J. A., and Saad, M. J. (2005). Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 13, 48-57.
- Choudhury, A. I., Heffron, H., Smith, M. A., Al-Qassab, H., Xu, A. W., Selman, C., Simmgen, M., Clements, M., Claret, M., Maccoll, G., et al. (2005). The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and beta cell function. *J Clin Invest* 115, 940-950.
- Clement, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J. F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., et al. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92-97.
- Costa, M. B., Ferreira S. R., Franco, L. J., Gimeno, S. G. and Iunes, M. (2000). Dietary patterns in a high-risk population for glucose intolerance. Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. *J. Epidemiology* 10, 111-117.

Dyson J. M., O'Malley C. J., Becanovic J., Munday A. D., Berndt M. C., Coghill I. D., Nandurky H. H., Ooms L. M. and Mitchell C. A. (2001). The SH2-containing inositol polyphosphatase 5-phosphatase, SHIP2, binds filamin and regulates submembraneous actin. *J. Cell. Biol* 155, 1065-1079.

Clement, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J. F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., et al. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409, 92-97.

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

Folli, F., Saad, M. J., Backer, J. M., and Kahn, C. R. (1992). Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 267, 22171-22177.

Friedman, J. M. and Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.

Gagnon, A., Artemenko, Y., Crapper, T., and Sorisky, A. (2003). Regulation of endogenous SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP2) in 3T3-L1 and human preadipocytes. *J Cell Physiol* 197, 243-250.

Giuriato, S., Blero, D., Robaye, B., Bruyns, C., Payrastre, B., and Erneux, C. (2002). SHIP2 overexpression strongly reduces the proliferation rate of K562 erythroleukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 106-110.

Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272, 827-829.

He, J., Cheung, A. P., Wang, E., Fang, K., and Liu, P. (2001). High-performance liquid chromatographic analysis for a non-chromophore-containing phosphatidyl inositol analog, 1-((1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero)phospho)-1D-3-deoxy-myo-inositol, using indirect UV detection. *J Chromatogr A* 913, 355-363.

Horvath, T. L. (2005). The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 8, 561-565.

- Johnson, A. K., and Epstein, A. N. (1975). The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. *Brain Res* 86, 399-418.
- Kelner M., Snider B. and Wellman P. (2003). Complementary and alternative medicine: how do we Know if it works? *Healthcare Papers* 3, 10-28.
- Kisseleva, M. V., Cao, L., and Majerus, P. W. (2002). Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits Akt/protein kinase B phosphorylation and leads to apoptotic cell death. *J Biol Chem* 277, 6266-6272.
- Kisseleva, M. V., Wilson, M. P., and Majerus, P. W. (2000). The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* 275, 20110-20116.
- Kong, A. M., Speed, C. J., O'Malley, C. J., Layton, M. J., Meehan, T., Loveland, K. L., Cheema, S., Ooms, L. M., and Mitchell, C. A. (2000). Cloning and characterization of a 72-kDa inositol-polyphosphate 5-phosphatase localized to the Golgi network. *J Biol Chem* 275, 24052-24064.
- Kopelman, P. G., (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635- 643.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., Kubota, T., et al. (2004). Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest* 114, 917-927.
- Kudo, M., Saito, S., Owada, Y., Suzaki, H., and Kondo, H. (2000). Localization of mRNA for SHIP2, SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, in the brain of developing and mature rats. *Brain Res Mol Brain Res* 75, 172-177.
- Lin, X., Taguchi, A., Park, S., Kushner, J. A., Li, F., Li, Y., and White, M. F. (2004). Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 114, 908-916.
- Lips, D. L., and Majerus, P. W. (1989). The discovery of a 3-phosphomonoesterase that hydrolyzes phosphatidylinositol 3-phosphate in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 264, 19911-19915.

- Majerus, P. W., Kisseleva, M. V., and Norris, F. A. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem* 274, 10669-10672.
- Martins, A. S., Crescenzi, A., Stern, J. E., Bordin, S., and Michelini, L. C. (2005). Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension* 46, 1004-1009.
- Marx, J. (2003). Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* 299, 846-849.
- Matzaris, M., Jackson, S. P., Laxminarayan, K. M., Speed, C. J., and Mitchell, C. A. (1994). Identification and characterization of the phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphate 5-phosphatase in human platelets. *J Biol Chem* 269, 3397-3402.
- Muraille, E., Pesesse, X., Kuntz, C., and Erneux, C. (1999). Distribution of the src-homology-2-domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP-2 in both non-haemopoietic and haemopoietic cells and possible involvement of SHIP-2 in negative signalling of B-cells. *Biochem J* 342 Pt 3, 697-705.
- Niswender, K. D., Morrison, C. D., Clegg, D. J., Olson, R., Baskin, D. G., Myers, M. G., Jr., Seeley, R. J., and Schwartz, M. W. (2003). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52, 227-231.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates.*, 4th edn (San Diego, Academic Press).
- Plum, L., Schubert, M., and Bruning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16, 59-65.
- Rameh, L. E., and Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274, 8347-8350.
- Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Schurmans S., Carrió R., Behrends J., Pouillon V., Merino J. and Clement S. (1999). The mouse SHIP2 (INPPL1) gene: complementary DNA, genomic structure, promoter analysis, and gene expression in the embryo and adult mouse. *Genomics* 62, 260-271.

- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Singh, A. K., and Jiang, Y. (1995). Quantitative chromatographic analysis of inositol phospholipids and related compounds. *J Chromatogr B Biomed Appl* 671, 255-280.
- Sleeman, M. W., Wortley, K. E., Lai, K. M., Gowen, L. C., Kintner, J., Kline, W. O., Garcia, K., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., and Glass, D. J. (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat Med* 11, 199-205.
- Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Buchse, T., and Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31, 1170-1181.
- Spiegelman, B. M., and Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.
- Torsoni, M. A., Carvalheira, J. B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M. A., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2003). Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E216-223.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.
- Velloso, L. A., Folli, F., Sun, X. J., White, M. F., Saad, M. J., and Kahn, C. R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12490-12495.
- Velloso, L. A., Kampe, O., Hallberg, A., Christmanson, L., Betsholtz, C., and Karlsson, F. A. (1993). Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 91, 2084-2090.

Wisniewski, D., Strife, A., Swendeman, S., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Kavanaugh, W. M., Tempst, P., and Clarkson, B. (1999). A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93, 2707-2720.

Woodcock, E. A. (1997). Analysis of inositol phosphates in heart tissue using anion-exchange high-performance liquid chromatography. *Mol Cell Biochem* 172, 121-127.

Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S. (2005). PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115, 951-958.

7- ANEXOS

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

O Ketalar foi obtido da Parke-Davis (Brasil), e o Diazepam da União Química Farmacêutica Nacional S/A (Brasil). A Insulina regular humana (Humulin R) foi adquirida da *Biobrás* (BH, Brasil). O antibiótico - Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte foi adquirido da Fort Dodge (Brasil). Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glicerol, albumina e o LY 294002 foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, Mo., USA). Proteína A com iodo radioativo (^{125}I) procedia da *Amersham* (Amersham, UK), e a Proteína A Sepharose 6 MB da *Pharmacia* (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, 0.45 μm) foi obtida da *Amersham* (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico foi adquirido da *Cristália* (Itapira/SP, Brasil). Os anticorpos anti-IR (sc#711), anti-IRS2 (sc#8299), anti-p85/PI3kinase (sc#423), anti-SHIP1 (sc#6244), anti-SHIP2 (sc#14504), e anti-fosfotirosina (sc#508) foram obtidos da *Santa Cruz Biotechnology* (CA, USA). O anticorpo anti-NeuN foi adquirido da Chemicon Internacional (temecula, CA, USA). O fosfatidilinositol(PI), PIP₁ e PIP₂ foram fornecidos pela Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). O PIP₃ e a placa de TLC foram adquiridos pela Merk (Merk KgaA, Darmstadt, Germany). O PI_{4,5}P₂ inisitol-2-³H(N) foi fornecido pela Perkin Elmer (Boston, MA, USA). A DNAase pela Promega (Madison, WI, USA) e o SYBR Green PCR Master Mix pela Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Soluções utilizadas

- Tampão de extração A (extrato total): foi utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.

- Tampão de Laemmli (5X): foi usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.
- Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída 1:4.
- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida estocada a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas: contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução Basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: Cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 0,02%.
- Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.
- Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: foi utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que são posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X-100 1% e 0,1 mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina são acrescidos no momento do uso.

- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: contém: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e Triton X-100 0,5%.
- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.
- Solução com proteína A marcada com ^{125}I : permite a visualização das bandas em autoradiografia, contém 0,1% de leite desnatado, dissolvido em solução basal com 2 μCi de proteína A ^{125}I .

Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar-Hannover entre 8 e 12 semanas de idade, pesando aproximadamente 250-300g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os ratos foram alimentados com água e ração para roedores da marca Purina. Os ratos foram mantidos em jejum por 6 a 12 horas.

MÉTODOS

Procedimentos Cirúrgicos

Os ratos foram anestesiados com mistura de Ketalar - 50 mg e Diazepam - 10 mg. A dose aplicada foi de 0,2 ml/100g de peso corporal em cada animal. Em seguida, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para inserção de uma cânula no ventrículo lateral.

Ao final da cirurgia, os ratos receberam 0,2 ml (1,7g em 3 ml) de antibiótico profilático intramuscular, e foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), em ciclo de 12 horas luz e 12 horas de escuro, recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

Cirurgia de Estereotáxia

Os animais foram anestesiados e posicionados no aparelho de estereotaxia. Após a exposição do periósteo, o bregma foi visualizado e utilizado como ponto de referência. As coordenadas utilizadas para inserir a cânula no ventrículo lateral foram obtidas no Atlas Paxinus (Antero-posterior: 0,2 mm; lateral: 1,5 mm e dorso-ventral: 4,2 mm). Após a inserção da cânula cuidadosamente, esta foi fixada com o auxílio deacrílico odontológico. O animal foi deixado em gaiola individual para se recuperar da cirurgia por 7 dias ¹³.

Infusão Intracerebro-Ventricular (ICV)

A infusão foi realizada de acordo com o descrito por Carvalheira et al. ¹³. As doses utilizadas variaram na concentração de acordo com o protocolo realizado, como será demonstrado na legenda das figuras.

Determinação da Ingestão Alimentar

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e mantidos por um período de adaptação de 7 dias com o manuseio diário da animal. Após este período os animais foram utilizados para a avaliação da ingesta. A quantidade de ração ingerida foi monitorada durante 12 horas (18:00 às 6:00). Em todos os protocolos por nós utilizados, os animais não foram previamente colocados em jejum. Quando necessário a insulina R foi aplicada minutos antes do início do monitoramento.

Extração do Tecido

Os animais foram anestesiados e submetidos à extração do hipotálamo. Após a retirada do hipotálamo, este foi colocado imediatamente em tubo tipo *Falcon* contendo tampão de extração, mantido todo o tempo no gelo. O tecido foi homogeneizado durante 20 segundos com processador do tipo “polytron”, operado em velocidade máxima. No final da extração, foi adicionado Triton X-100 1% em todas as amostras. Após quarenta minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação. Utilizamos a

velocidade de 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto; outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente, foram aplicados em gel de poliacrilamida; e finalmente outra parte foi utilizada para imunoprecipitação com anticorpos específicos.

Immunoblotting ou Westernblotting

Alíquotas contendo 200 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 25 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2, sob refrigeração contínua por gelo.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal por 3 sessões de 10 minutos, e incubadas com anticorpo antifosfotirosina diluído em solução tampão por 4 horas, a temperatura ambiente sob agitação constante, ou durante uma noite a 4°C. A seguir as membranas foram lavadas novamente com solução basal por 3 sessões de 10 minutos e incubadas em solução com proteína A, marcada com ¹²⁵I, durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso de proteína A foi lavado com solução basal e então, as membranas foram expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com

intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete mantido a -80°C. Após 12 - 48 horas, os filmes foram revelados na forma convencional. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

Imunoprecipitação

Volumes das amostras com a mesma concentração protéica foram utilizadas para imunoprecipitação com anticorpos específicos, sendo que a determinação das proteínas seguiu as etapas descritas anteriormente. As amostras foram incubadas durante 12-14 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida, foi acrescentada proteína A-Shepharose 6MB em todas as amostras para precipitação do complexo antígeno/anticorpo, sendo mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específico para lavagem. As proteínas precipitadas, a seguir, foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas foram então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo as etapas descritas no item *Immunoblotting*. Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas foram submetidas ao *blotting* com anticorpo antifosfotirosina, anti-PI 3-quinase e anti-5ptase IV.

Atividade da PI 3 Kinase

Hipotálamos de ratos agudamente tratados com salina ou insulina 10^{-6} M por via icv, foram submetidas à extração protéica em 1,0 ml de tampão contendo Hepes 50 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 2 mM, PMSF 2 mM, aprotinina 2 mg/ml, leupeptinina 5 mg/ml, benzamidina 10 mM, glicerol 10%, NP-40 1%, dd H₂O 27,8 %.

Os homogenizados, mantidos sempre em gelo, foram a seguir centrifugados por 15 min, a 12.000 rpm em centrífuga Eppendorf refrigerada. O sobrenadante foi retirado e realizou-se a quantificação e normalização protéicas. Em seguida, as amostras contendo 5,0 mg de proteínas totais foram submetidas a imunoprecipitação com 15 µl de anticorpo específico (IRS2), *overnight* à 4°C, sendo a seguir adicionado 120 µl de proteína A Sepharose (previamente lavada como descrita a seguir) e mantidas sob agitação contínua à 4°C durante 2 horas. Então as amostras foram centrifugadas por 3 min a 12.000 rpm e descartado o sobrenadante. Em seguida as amostras foram lavadas três vezes, com cada tampão descrito abaixo, com o volume de 1,0 ml cada vez.

Tampão A: PBS 0,1 M, pH 7,4, NP-40 1%, 100 µM Na₃VO₄.

Tampão B: Tris 100 mM, pH 7,5, LiCl₂ 500 mM, Na₃VO₄ 100 µM, H₂O 89% qsp.

Tampão C: Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 100 µM, H₂O 96% qsp.

Após as lavagens os *pellets* foram secos com pipeta e re-diluídos em 50 µl do tampão C, sem ortovanadato, adicionando-se então, 10 µl de MgCl₂ 100 mM e 10 µl de inositol fosfato (PI) (2 mg/ml) sonicado anteriormente durante 1 min no gelo na seguinte solução: 10 mM de Tris, pH 7,5 e EGTA 1 mM.

Iniciou-se então a reação, adicionando às amostras 5 µl de solução contendo o seguinte: 30µl de ATPγ ³²P, 10 µl de MgCl (100 mM), 4,4 µl de ATP 10 mM e 5,6 µl de H₂O. A reação foi interrompida após 10 min com 180 µl do seguinte tampão: 2,0 ml de HCl, 8,0 ml de clorofórmio, 8,0 ml de metanol.

As amostras foram centrifugadas sendo removida a fase orgânica inferior, que foi aplicada nas placas (cerca de 50 µl de cada amostra) de TLC previamente tratadas com oxalato de potássio a 1%. A placa foi então inserida em um frasco contendo o seguinte tampão de corrida: 120 ml de CHCl₃, 94 ml de CH₃OH, 22,6 ml de H₂O e 2,4 ml de NH₄OH. Depois de aproximadamente 4 horas de corrida, a placa foi exposta a um filme de RX e depois de 24 horas, este foi revelado de forma convencional e a análise feita através de densitometria digital.

A proteína A Sepharose utilizada no experimento de determinação da atividade da PI3 quinase associada à IRS2 foi lavada da seguinte forma: tomou-se o conteúdo total do frasco e transferiu-se para um tubo de polietileno de 50 ml. Centrifugou-se por 15 min à 4°C e retirou-se o sobrenadante, adicionando igual volume de 1% BSA em PBS 0,1 M, pH 7,4. Incubou-se por 30 min à 4°C e re-diluiu-se a 50% (volume/volume) em PBS 0,1 M, pH 7,4.

Imunohistoquímica e Imunofluorescência

Ratos foram anestesiados, e após a perda dos reflexos pediosos e corneanos, realizou-se toracotomia mediana com posterior canulação trans-cardíaca da aorta torácica. Os animais foram então perfundidos com cerca de 80 ml de solução fisiológica heparinizada (0,01% volume/volume), e a seguir 80 ml de paraformaldeído (Sigma) a 4%, dissolvido em água destilada pré-aquecida e tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. Ambas as perfusões foram feitas com bomba de infusão, numa velocidade fixa de 4,0 ml/min. A seguir foi realizada craniotomia e o hipotálamo foi cuidadosamente retirado. O órgão foi então processado com álcool em diferentes concentrações (70%,80%,95% e 100%), xilol, e xilol/parafina. A seguir, o órgão foi incluído em bloco de parafina, onde foi seccionado em cortes de 5 µm e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso de cerca de 24 horas (para completa fixação dos cortes) as lâminas foram desparafinizadas com xilol, re-hidratadas com as diferentes concentrações de álcool e lavadas cerca de três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4.

A seguir foi iniciada a reação de imunofluorescência na qual, os cortes foram tratados com Triton X-100 por 10 min e novamente lavados três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4. A seguir, bloqueados com leite desnatado 5%, diluídos em PBS 0,1 M, pH 7,4 por uma hora. Os cortes foram incubados com anticorpos primários específicos diluídos em leite desnatado 1% e PBS 0,1 M, pH 7,4, overnight, à 4°C. A seguir foram lavados três vezes como anteriormente e novamente incubados, usando agora o anticorpo secundário conjugado com biotina (Sigma) em leite desnatado 1% e PBS 0,1 M, pH 7,4, na diluição de 1/500, durante 2 horas. Novamente os cortes foram lavados e incubados com streptoavidina associado ao fluorocromo (Cy-3) na diluição de 1/500 em leite desnatado 1% em PBS 0,1M,

pH 7,4, durante uma hora e protegidos da luz. Finalmente, depois de lavados, as lâminas foram montadas com Vectashield® (Vector), para posterior análise do tecido por microscopia óptica de fluorescência.

Microscopia confocal

Os hipotálamos fixados com paraformoldeído foram seccionados (5 µm) e trabalhados em imunofluorescência simples ou dupla usando os anticorpos anti-IR (1/20), anti-SHIP2 (1/50), anti-SHIP1 (1/50), Anti-NeuN (1/100) e anti-5ptase IV (1/50), de acordo com protocolos descritos anteriormente (Araujo et al., 2002). As análises e a foto-documentação dos resultados foram realizadas usando o Microscópio Laser Confocal Zeiss LSM 510. As correlações anatômicas foram feitas de acordo com as coordenadas conhecidas pelo atlas estereotático (Paxinos and Watson, 1997).

Produção do anticorpo contra 5ptase IV

Obtivemos a sequência completa de ácidos nucleicos de mRNA e de aminoácidos da 5ptase IV, e com base nestas sequências projetamos um peptídeo para imunização de coelhos para obtenção de anticorpos policlonais. A sequência de aminoácidos utilizada foi N-YVLLSSAAHGVLYM-COOH. Coelhos machos *New Zeland White* de aproximadamente 2,5 kg de peso vivo foram submetidos a três etapas de imunização sendo que na primeira etapa o antígeno (0,5 mg) foi homogenizado com adjuvante completo de Freund e nas duas etapas subsequentes com adjuvante incompleto de Freund. As imunizações foram realizadas por via subcutânea dorsal com intervalo de quatro semanas entre as etapas. Antes de cada imunização amostras de sangue pré-imune e trans-imune foram colhidas. No total, quatro coelhos foram imunizados e 4 semanas após a terceira imunização a presença de anticorpos específicos contra 5ptase IV foi testada por imunoprecipitação seguida de imunoblot e por imunoblot de extrato total de hipotálamo.

Tratamento com Oligonucleotídeos

Ratos previamente submetidos à canulação de ventrículo lateral foram tratados durante 4 dias com 2 doses diárias de oligonucleotídeo produzidos pela Invitrogen Corp. Foi utilizado para os experimentos os oligonucleotídeos Antisense 5ptase IV (AS) (5' – AGC TGT CCC TGG AGC AT – 3'), Sense 5ptase IV (Sen) (5' – ATG CTC CAG GGA CAG CT – 3'), Sense SHIP2 (5' – CTG CGG AGG AGC TGC T – 3'), Antisense SHIP2 (5' – AGC AGC TCC TCC GCA G – 3'), Sense SHIP1 (5' – GGA ACA TGG GTA ATG CAC CC – 3') e Antisense SHIP1 (5' – GGG TGC ATT ACC CAT GTT CC – 3'). Todas as seqüências foram selecionadas entre pares de oligonucleotídeos não relacionados baseada na sua habilidade de inibir a expressão da 5ptase IV, como verificado pelo imunoblotting do extrato total de hipotálamo utilizando o anticorpo anti-5ptase IV. O antisense SHIP2 foi profundamente caracterizado em estudos anteriores (Bertelli, 2003). Todas as seqüências dos antisenses foram submetidas à análise do BLAST (Altschul, 1997) e corresponde somente a seqüência da 5ptase IV de *Rattus norvegicus*. Os oligonucleotídeos foram injetados em quantidade de 2 nmol diluído em 2 µl de TE. Ao final do tratamento os animais foram utilizados em experimentos de avaliação de ingestão alimentar, determinação de produção de fosfatidilinositol 3'P e imunoblot.

PCR e Sequenciamento da 5ptase IV

Cinco fragmentos do DNAc da 5ptase IV de *Rattus norvegicus* foram obtidos pelo método do RT-PCR a seguinte seqüência de primer: 5'CAT GGA AAT CAG GGT CTG TG-3', 5'CCG GGT TTC TAG AGT GAT AC-3', 5'CCC ATG GTT TTC CAG AGT AC-3', 5'CTC CTC CGG TTC ATT CAG AT-3', 5'CCC AGC TCT CAT TTC TCA CA-3', 5'GAA GCC ATT CAA AGG ACG GA-3', 5'ATC TGG AGG GAA GTC TTC TG-3', 5'TCA AGA CAC AGT GCA CAC AG- 3'. Todos os cinco fragmentos foram subsequentemente clonados em vetor pGEM – T Easy, seqüenciado usando os primers SP6 e T7 e as homologias foram avaliadas pelo BLAST.

Real-time PCR

Os animais foram anestesiados, e o córtex frontal, hipocampo, hipotálamo, mesencéfalo, corpo estriado e cerebelo foram dissecados e mantidos em gelo e nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram então imersas em trizol e homogenizadas por 30 seg em velocidade máxima. O RNA total foi isolado de acordo com as orientações do fabricante e quantificado por espectrofotometria. A integridade do RNA foi verificada por gel de agarose 1% ethidium-bromide-stained e a intensidade da proporção de 28S/ 18S rRNA de fluorescência foi determinada. Somente as amostras que foram de encontro aos nossos critérios de qualidade (ambos 260/280nm e 28S/18S > 1.8) foram incluídas nos experimentos. As amostras de RNA tratadas com DNAase á 37°C por 30 minutos e a enzima ativada á 65°C por 10min. Todas as 36 amostras foram purificadas e 1.6µg do RNA total foi transcrito ao mesmo tempo usando um máster mix contendo um primer oligo(dt) e Super Script III em um volume final de 20µg. A sequência de pares do primer foram usadas para amplificar o produto de 96 bp correspondendo ao gene da 5ptase IV de interesse. (gi/62644778): sense 5' CGA GGT TCT GGG TCT TCT G 3' e antisense 5' ATT GGG GTG CTG ACT TTG A 3' um produto de 162bp para o gene referência Gapd (NM-017008) sense 5' CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC 3' e antisense 5' GAA CTT GCC GTG GGT AGA G 3' um produto de 172bp para o gene referência Actb (NM 031144) sense 5' CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC 3' e antisense 5' GCC ACC AAT CCA CAC CGA 3' e um produto de 101bp para o gene de referência Ppia (NM 017101) sense 5' AAT GCT GGA AAC ACA AA 3' e antisense CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA 3'. As especificidades dos produtos foram confirmadas pela análise do BLAST e pela eletroforese de gel de agarose 3% ethidium-bromide-stained. A análise da expressão gênica pelo RT-PCR foi transportada pelo ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A concentração ótima do DNAc e dos primers, assim como sua eficiência máxima de amplificação foram obtidas através da análise de 5 pontos da curva de diluição (2X) para cada gene. Cada reação de PCR contendo 2.5 ng ou 5.0 ng de RNA transcrito reversa (dependendo do gene), 200 nM de cada primer específico, SYBR Green PCR Master Mix, e RNAase livre de água á 20 µL de volume final. Amostras de DNAc de todas as áreas do cérebro foram processadas ao mesmo tempo em triplicata para cada gene e um controle negativo incluído para cada área do cérebro/primer. As condições para o PCR foram: 10 min

á 95°C, seguida por ciclos 40 por 40 á 95°C por 15s e 60°C por 60s, e de etapas de melting da curva de diluição foi realizada após cada corrida para confirmar a especificidade dos produtos e a ausência dimers primers. O dados do Real-time foram analisados usando a Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). A quantidade de expressão da 5ptase IV nas áreas cerebrais foram calculadas de acordo com estudos anteriores (Vandesompele et al., 2002).

Ensaio da atividade da 5-fosfatase IV

Para determinar a atividade catalítica da 5ptase IV em relação ao inositol 5' fosforilado nós adaptamos um método descrito anteriormente (Matzaris et al., 1994). Em resumo, a 5ptase IV foi imunoprecipitada em amostras contendo (2.0 mg de proteína total) de hipotálamo de ratos canulados ICV tratados com salina ou com AS5ptase e com/sem insulina, com descrito acima. Os peletes com Proteína A Sepharose forma ressuspensos com 50 µl de solução contendo 20 mM de Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 200 µg/ml albumina bovina, 3.0 mM MgCl₂, 2.0 mM brometo de cetiltriethylamonio, e 250 mM [³H]PI_{4,5}P₂ (3,500 cpm/nmol). As reações foram mantidas por 30 min a 37 °C e foram interrompidas pela adição de 500 µl of 2.0 M KCl e 200 µl clorofórmio/metanol (1:1). Os produtos foram separados por TLC em clorofórmio/metanol/ácido acético/H₂O (43:38:4:7). Os lípedes na placa de TLC foram visualizados por iodine staining e comparados com a migração do conhecido standards PI, PI₄P₁, e PI_{4,5}P₂. Os produtos das reações foram aplicados na placa de TLC e quantificados pela cintilação líquida. As amostras das proteínas hipotalâmicas tratadas com anticorpo 5ptase IV, mas somente com a Protein A Sepahrose foram usadas para controle. Os resultados foram representados em porcentagem de PI_{4,5}P₂/PI₄P₁ obtidos da reação em amostras controle.

Análise dos PIs pelo HPLC por troca iônica

O método usado para avaliar os PIs já foi descrito anteriormente (Bertelli, 2003; Lips e Majerus, 1989; Singh e Jiang, 1995 e Woodcock, 1997). De forma breve, para cada condição experimental os hipotálamos de três ratos foram retirados e homogenizados em 1,8 ml de solução contendo metanol/clorofórmio/HClO₄ (8%) (20:10:1). Após a adição de 500 µl

de clorofórmio e 500 µl de HClO₄ (1%) a fase orgânica inferior foi coletada e lavada duas vezes com HClO₄ (1%) e a seguir evaporada. Deacetilação foi realizada como anteriormente descrito (Lips e Majerus, 1989). O produto da deacetilação foi resolvido em coluna de troca aniônica (Shodex Aschipak E8502 N7C) com gradiente de 980µM (A), 3 M NaH₂PO₄ (B), pH 3.8. O gradiente linear foi aumentando de 7 % durante 30 min, uma etapa de 1 min a 15 % foi seguida por um gradiente linear de 30 % B a 60 min, seguido de um gradiente linear de 60 % B durante 80 min. Finalmente, o tampão B foi aumentando de 100 % durante 5 min. Os PI, PI₅P₁, PI_{4,5}P₂ e o PI_{3,4,5}P₃ altamente purificados e não-fosforilados foram usados como controle. O fosfatidilinositol 3' P foi detectado como um pico entre 30 e 41 minutos.

HPLC com índice refrativo

As análises foram realizadas como previamente descritas, no entanto com algumas modificações (He et al., 2001). Resumidamente, as amostras foram preparadas como mostrado acima pela Análise dos PIs pelo HPLC por troca iônica, e os PI, PI₅P₁, PI_{4,5}P₂ e PI_{3,4,5}P₃ foram analisados usando Waters HPLC com índice refrativo composto de bombas 515 HPLC, um cromatógrafo com índice refrativo 2414 com um sensor (Waters Corp., Milford, MA, USA). A coluna da fase reversa foi equilibrada com 0.015 M de solução de ácido fórmico contendo 60 % de MeOH e 0.4 % hidróxido de tetrabutilamoníaco, pH 4.3 e amostras (20 µl) foram resolvidas através de uma coluna que foi aquecida a 35°C. Os índices refrativos foram usados como unidades arbitrárias para a análise comparativa e semi-quantificativa.

Hibridização *in situ*

Para preparar os tecidos, ratos naïve foram anestesiados profundamente e imediatamente após a parada respiratória, a toracotomia foi realizada para permitir a perfusão transcardíaca (20 ml/min) com 0.01 M de tampão salina-fosfato (150 ml), seguida pelo paraformoldeído 4 % em 0.1 M de tampão salina-fosfato, com pH 7.2, durante 60 min. O cérebro foi removido, armazenado por 4hs na mesma solução de paraformoldeído, e então imersa na solução fixante com gradientes sucrose (20-30 %). As amostras foram estocadas a -80 °C. Várias secções (20 µm) do hipotálamo foram obtidas de acordo com coordenadas

dadas pelo atlas (Paxinos and Watson, 1997). Os experimentos foram conduzidos em duplicata: para cada rato, fatias com dois wells (poços) foram hibridizadas com antisense e dois com sense (controle negativo) ^{35}S -oligonucleotides para 5ptase IV. Os experimentos de hibridização foram realizados com descrito em estudos anteriores (Martins et al., 2005). Em poucas palavras, as probes de oligodeoxinucleotideo complementam a sequência de nucleotídeo de ratos 2121-2141 (NCBI-NIH gi|62644778|), ou a sequência sense respectiva, foram marcadas com ^{35}S ATPd usando transferase deoxinucleotidil (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Após remover a radioatividade não-incorporada, as probes foram diluídas em tampão de hibridização para prover aproximadamente $0.3\text{-}0.5 \times 10^6$ cpm /100 μ . A reação de hibridização foi feita em secções free-floating (~12-16/tube) incubadas overnight com ^{35}S -probe (~300 μL), seguida pela alta estringência do tratamento pós- hibridização. Os cortes montados sobre as lâminas de polilisina foram submetidos á autoradiografia (exposição á emulsão líquida Kodak NTB-2) e contra corados com violeta de cresil. As áreas hipotalâmicas foram identificadas pelo exame do campo claro. Depois da localização da área desejada, as fotos foram trabalhadas no escuro. As medidas da densitometria (unidades arbitraries) foram feitas sobre as imagens adquiridas no escuro (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). A mensuração do background foi retirada das áreas adjacentes que não mostraram marcação.

Análise Estatística

A quantificação das bandas presentes blots ou PIP na placa de TLC foi feita por densitometria utilizando o programa ScionImage – Scion Corporation.

O nível de significância adotado foi $p < 0.05$. Com relação aos dados obtidos (controle e tratado com oligonucleotídeos) foi utilizada análise de variância para comparação múltipla seguida pelo teste Bonferroni. As análises foram feitas utilizando-se o programa “STATISTICA” (versão 4.3, 1993) da StatSoft, Inc.

Para o RT-PCR os valores obtidos em relação a fosfatase 5ptase IV, em cada área do cérebro, foram comparados usando ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.