



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

PAULA GABRIELE FERNANDES QUARESMA

“Proteína CLK2 (Cdc2-like kinase 2) no hipotálamo é importante para a manutenção da
homeostase energética.”

Campinas

2017

PAULA GABRIELE FERNANDES QUARESMA

“Proteína CLK2 (Cdc2-like kinase 2) no hipotálamo é importante para a manutenção da
homeostase energética.”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutora em
Ciências na área de Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Prada

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE “PROTEÍNA CLK2 (CDC2-LIKE KINASE 2) NO
HIPOTÁLAMO É IMPORTANTE PARA A MANUTENÇÃO
DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA.” DEFENDIDA PELA
ALUNA PAULA GABRIELE FERNANDES QUARESMA, E
ORIENTADA PELA PROFa. DRA. PATRÍCIA DE
OLIVEIRA PRADA.

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/10058-3; FAPESP, 2015/16561-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Q26p Quaresma, Paula Gabriele Fernandes, 1987-
Proteína CLK2 (Cdc-2-like kinase 2) no hipotálamo é importante para a manutenção da homeostase energética / Paula Gabriele Fernandes Quaresma. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Patrícia de Oliveira Prada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipotálamo. 2. Homeostase. 3. Leptina. 4. Insulina. I. Prada, Patrícia Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hypothalamic CLK2 is important for energy homeostasis

Palavras-chave em inglês:

Hypothalamus

Homeostasis

Leptin

Insulin

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Patrícia de Oliveira Prada [Orientador]

Gabriel Forato Anhé

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Lício Augusto Velloso

Renata Frazão

Data de defesa: 28-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

PAULA GABRIELE FERNANDES QUARESMA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA

2. PROF. DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO

3. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ

4. PROFA. DRA. RENATA FRAZÃO

5. PROFA. DRA. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 28/07/2017

Dedico este trabalho aos meus avós, que não puderam ver este sonho acontecendo.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico -CNPQ e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT de Obesidade e Diabetes; pelas bolsas concedidas e financiamento das pesquisas que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

A minha estimada orientadora, Professora Patrícia de Oliveira Prada, pela confiança depositada em mim, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento durante esses anos e pela orientação em cada etapa deste trabalho.

Ao meu supervisor de estágio no exterior, Professor Young-Bum Kim, obrigada pela confiança ao me receber, pelas oportunidades de aprendizado e orientação.

As universidades que moram no meu coração, Universidade Estadual de Campinas e Universidade de Harvard.

Ao Professor Mario Saad, pela inspiração e pela estrutura de laboratório sempre a nossa disposição.

Aos meus colaboradores, Professor José Donato Junior, Professor Jackson Bittencourt, Professora Iscia Lopes Cendes, Laís Weissmann, Tamires Zanotto, Gisele Castro, Fernando Simabuco, Isadora Clivatti, Alexandre Hilário, Mincheol Kang, Aykut Uner, Sangsoo Kim e Sung-Wan Kim.

Ao apoio técnico dos funcionários Seu Luiz, Lígia, Ramon, Sandra, Jósimo, Dioze, Andrey e Wendy.

Aos companheiros de bancada do LICRI e da Divisão de Endocrinologia e Metabolismo do BIDMC, que fizeram meus dias melhores e a rotina de experimentos mais leve.

Aos funcionários dos Biotérios da UNICAMP e do BIDMC, que prestaram um apoio inestimável ao prover e cuidar dos animais experimentais.

Aos amigos inestimáveis que encontrei em Boston, vocês me acolheram e se tornaram minha segunda família, Katherine, Anna, Lujain, Ragbhir, Nalva, Mike, Marina, Ricardo, Maria Lúcia, Gal, Marilena, Su, Ludivine, pessoal do PUB-Boston e Comunidade Santo Antônio de Cambridge.

De forma especial, agradeço a todos da minha família e meus amigos pelo apoio, pelo cuidado, pelas orações, pela torcida organizada, pelas comemorações, por enxugarem minhas lágrimas e ouvirem meus lamentos e, principalmente, pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente devido ao meu Doutorado.

Aos meus pais, Celso e Marcia, e aos meus irmãos e cunhados, que me ajudaram a subir todos os degraus da minha vida e que me apoiaram incondicionalmente desde o início do meu sonho, que acreditaram em mim até quando eu mesma não acreditava. Vocês me deixaram sempre livre para voar e me ofereceram um ninho seguro para voltar. Obrigada pelo amor e amizade! Obrigada José Eduardo e Josué por me ensinarem que o amor cresce mesmo com a distância!

Ao meu amor, Jordano, que deu cada passo deste Doutorado ao meu lado, me apoiou, me entendeu, organizou meus pensamentos, embarcou no meu sonho, abrandou minhas angústias e foi o meu melhor companheiro de aventuras.

Por fim, agradeço a Deus por todas as bênçãos durante o Doutorado.

“ Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vive-la como se os milagres não existissem. E a segunda é vive-la como se tudo fosse milagre. ”

Albert Einstein

RESUMO

A obesidade tem alta prevalência mundial, é caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo que afeta negativamente a saúde de um indivíduo. Os hormônios insulina e leptina agem no hipotálamo e, a partir de sua sinalização intracelular, são capazes de modificar a expressão de neuropeptídeos, levando ao equilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético. A Cdc2-like kinase 2 (CLK2) é uma quinase descrita no fígado e tecido adiposo marrom (BAT) que responde à insulina e pode regular a gliconeogênese no fígado e a termogênese no BAT. Animais submetidos cronicamente à dieta hiperlipídica apresentam deficiência na regulação de CLK2 nesses tecidos. Sendo assim, os objetivos do presente estudo são avaliar a expressão e regulação da proteína quinase CLK2 no hipotálamo em resposta a insulina e leptina e seu possível papel no controle do metabolismo energético. Nossos resultados demonstraram com ineditismo que a CLK2 é expressa em neurônios hipotalâmicos; sua fosforilação no sítio treonina 343, correspondente a sua maior atividade, foi aumentada pela realimentação precedida de jejum prolongado e pelos hormônios insulina e leptina injetados agudamente por via intracerebroventricular. Essa resposta foi dependente de PI3K e AKT. A fosforilação em treonina 343 da CLK2, em resposta a insulina e leptina, foi reduzida no hipotálamo de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e nos modelos de obesidade *dbdb*, que possuem deficiência do receptor de leptina. A inibição farmacológica e também a deleção da expressão da CLK2 no hipotálamo induziu obesidade, pelo menos em parte, devido a hiperfagia e pela diminuição do gasto energético. Por outro lado, a superexpressão de CLK2 no hipotálamo de animais obesos, acarretou em diminuição da massa corporal e adiposa, da ingestão alimentar e aumentou o gasto energético. Os dados deste trabalho sugerem que a CLK2 integra a sinalização de insulina e leptina do hipotálamo contribuindo para o controle da homeostase energética, sendo uma molécula promissora como alvo terapêutico da obesidade.

Palavras-chave: hipotálamo; homeostase; leptina; insulina.

ABSTRACT

Obesity prevalence is increasing worldwide and it is characterized by excess of adipose tissue potentially harmful for health. The hormones insulin and leptin act in hypothalamus and through their intracellular signaling can modify neuropeptides expression, leading to the balance between food intake and energy expenditure. CLK2 was described in liver and BAT as a kinase responsive to insulin that regulates gluconeogenesis in liver and thermogenesis in BAT. Mice chronically fed with high-fat diet have shown impairment in CLK2 regulation in those tissues. In this sense, the aims of this study were to investigate CLK2 expression and regulation in hypothalamus in response to insulin and leptin and its hypothetical role in energy metabolism control. Our data shows for the first time that CLK2 is expressed in hypothalamic neurons and CLK2 threonine 343 phosphorylation was crucial for this kinase activity, furthermore, CLK2 phosphorylation was induced by refeed after prolonged fasting and by ICV injections of insulin and leptin. This effect was dependent of PI3K and AKT. Clk2 threonine 343 phosphorylation, in response to insulin and leptin, was decreased in HFD-fed and *dbdb* mice. Pharmacological inhibition as well as deletion of CLK2 expression in hypothalamus induced obesity due, at least in part, to hyperphagia and energy expenditure depletion. On the other hand, CLK2 overexpression in hypothalamus of obese mice led to body weight, adiposity and food intake decrease and energy expenditure increase. Data shown herein suggest that CLK2 integrates hypothalamic insulin and leptin signaling, and contributes for energy homeostasis control, being a promising molecule for new therapeutic approaches for obesity.

Key words: hypothalamus; homeostasis; leptina; insulin.

LISTA DE ABREVIATURAS

IMC		Índice de Massa Corporal
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>	Substrato do receptor de insulina
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>	
AKT		Proteína quinase B
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>	
FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>	
AgRP	<i>Agouti-related protein</i>	
POMC	<i>pro-opiomelanocortin</i>	
LEPR	<i>Leptin receptor</i>	Receptor de leptina
ARC	<i>Arcuate nucleus</i>	Núcleo arqueado
DMH	<i>Dorsomedial nucleus</i>	Núcleo dorsomedial
VMH	<i>Ventromedial nucleus</i>	Núcleo ventromedial
LH	<i>Lateral hypothalamus</i>	Hipotálamo lateral
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>	Janus quinase 2
ICV	<i>intracerebroventricular</i>	intracerebroventricular
NPY	<i>Neuropeptide Y</i>	Neuropeptídeo Y
α MSH	<i>α melanocyte stimulating hormone</i>	
CLK2	<i>Cdc2-like kinase 2</i>	

BAT	<i>Brown adipose tissue</i>	Tecido adiposo marrom
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i>	
MBH	<i>Mediobasal hypothalamus</i>	Hpotálamo mediobasal
CeA	<i>Central amygdala</i>	Núcleo central da amígdala
siRNA	<i>Small interference RNA</i>	RNA de interferência
RER	<i>Respiratory Exchange rate</i>	Quociente respiratório
ITT	<i>Insulin Tolerance test</i>	Teste de tolerância a Insulina
GTT	<i>Glucose Tolerance test</i>	Teste de tolerância a Glicose
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>	Proteína fosfatase 2A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do vetor pShuttle	28
Figura 2. Construção de adenovírus recombinantes segundo o AdenoX Expression kit	29
Figura 3. Deleção de CLK2 em neurônios hipotalâmicos do MBH compromete homeostase energética.	52
Figura 4. Deleção de CLK2 em neurônios hipotalâmicos acarreta aumento de ingestão alimentar.	53
Figura 5. Diminuição da tolerância a glicose e sensibilidade a insulina após deleção de CLK2 hipotalâmica.	55
Figura 6. Aumento da expressão de marcadores de gliconeogênese e diminuição dos marcadores de termogênese em animais com deleção hipotalâmica de CLK2.	57
Figura 7. Deleção de CLK2 na área central da amígdala (CeA) não afeta metabolismo energético.	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
CAPÍTULO 1	
Artigo: Cdc2-like kinase 2 in hypothalamus is necessary to maintain energy	37
homeostasis	
CAPÍTULO 2	
Resultados obtidos após publicação	49
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO A	68
ANEXO B	69

INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como o acúmulo de tecido adiposo que afeta negativamente a saúde de um indivíduo. O critério mais difundido para classificação de obesidade e sobrepeso é o Índice de Massa Corporal (IMC), que é calculado dividindo-se o peso corporal pela altura ao quadrado. De acordo com a literatura, um indivíduo é considerado com sobrepeso se o IMC estiver entre 25 e 29,9 kg/m² e considerado obeso quando o IMC estiver igual ou maior que 30 kg/m² (Sperrin *et al.*, 2014).

Em 2008, a prevalência mundial de sobrepeso entre adultos maiores de 20 anos era de 35%, praticamente o dobro da prevalência registrada em 1980. Em 2014, aproximadamente 2 bilhões de adultos maiores de 18 anos, 39% da população mundial, apresentavam sobrepeso, e destes, 600 milhões eram obesos, aproximadamente 13%. Em todo o mundo, ao menos 2,8 milhões de mortes por ano são causadas pelo sobrepeso e obesidade (Organização Mundial de Saúde, 2017).

Nos Estados Unidos, a prevalência de obesidade em 2014 estava entre 36,5 e 38% do total da população adulta, destes, 8% apresentavam obesidade extrema (IMC $\geq$ 40 kg/m²). A proporção de jovens americanos com idade entre 17 e 24 anos que apresentam sobrepeso é de um em cada quatro, contribuindo com o gasto de milhões de dólares para tratamentos médicos desde a juventude (*National Center for Health Statistics*, 2017; *The State of Obesity*, 2016).

No Brasil, houve aumento de 26,3% na prevalência de sobrepeso em dez anos; em 2006 era de 42,6% dos adultos e, em 2016, verificou-se que 53,8% da população adulta apresentava sobrepeso. De forma alarmante, a prevalência de obesidade aumentou aproximadamente 60% em dez anos; em 2006 era de 11,8% dos adultos e chegou a 18,9% da população adulta em 2016 (VIGITEL Brasil 2016).

Outrora considerados problemas de países desenvolvidos, o sobrepeso e a obesidade, atualmente são também frequentes em países em desenvolvimento, particularmente nas áreas urbanas. A maior

parte da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade são mais prevalentes que a desnutrição (Organização Mundial de Saúde, 2017).

Existe a correlação positiva entre obesidade e doenças como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, câncer dentre outras (Stamler *et al.*, 1978; Hu *et al.*, 2004; Olshansky *et al.*, 2005; Pischon *et al.*, 2008; Berrington De Gonzalez *et al.*, 2010). Nesse sentido, houve aumento da prevalência de diabetes; de 5,5% em 2006 para 8,9% de indivíduos diagnosticados em 2016; e também na prevalência de hipertensão arterial que era de 22,5% e aumentou para 25,7% da população brasileira (VIGITEL Brasil 2016).

Em condições fisiológicas os mamíferos são capazes de manter o peso corporal por grandes períodos de tempo, mesmo com flutuações pontuais da quantidade de calorias ingeridas e demanda de gasto energético, sem modificação da adiposidade (Van Der Klaauw e Farooqi, 2015). Esta capacidade de ajustar a ingestão alimentar em resposta a mudanças de demanda energética é fundamental para a sobrevivência (Morton *et al.*, 2006) e o hipotálamo tem papel fundamental nesta regulação. O hipotálamo é considerado como o centro integrativo entre sinais hormonais e nutricionais advindos de órgãos periféricos e a homeostase energética (Belgardt e Bruning, 2010).

A identificação da ação hipotalâmica de nutrientes e hormônios periféricos, como insulina e leptina, tem auxiliado o entendimento dos circuitos neuronais que controlam o balanço energético (Belgardt *et al.*, 2008; Mesaros *et al.*, 2008; Konner *et al.*, 2009; Klockener *et al.*, 2011; Konner *et al.*, 2011; Morton e Schwartz, 2011).

O hormônio derivado do pâncreas, insulina, e o hormônio produzido pelos adipócitos, leptina, agem no hipotálamo, controlando a ingestão alimentar e o gasto energético (Schwartz *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2000; Woods e Seeley, 2000; Morton e Schwartz, 2001). No hipotálamo, a insulina sinaliza através do seu receptor que sofre uma modificação conformacional, ativando sua subunidade β

(White, 1997). Uma vez ativo, este sítio catalisa a fosforilação em tirosina de proteínas que contém o domínio SH2, como por exemplo, os substratos do receptor de insulina (IRS), sendo os mais estudados, o IRS-1 e o IRS-2. A fosforilação de IRSs promove a ligação e ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Uma vez ativa, a PI3K catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. O produto fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato gerado pela PI3K pode regular a quinase dependente de fosfoinositol 1(PDK-1), uma serina/treonina quinase que fosforila e ativa a proteína quinase B (AKT). A AKT fosforilada promove a fosforilação e a exclusão do núcleo celular do fator de transcrição *forkhead box O1* (FoxO1), modulando assim a transcrição de genes de interesse ao metabolismo energético. A FoxO1 participa da regulação do sistema melanocortina por meio do aumento da expressão do gene *Agouti-related protein* (AgRP) e da redução da expressão do gene *pro-opiomelanocortin* (POMC) no núcleo arqueado do hipotálamo (Sasaki e Kitamura, 2010).

Camundongos *obob* que possuem deficiência na produção de leptina, ou camundongos *dbdb* que apresentam mutação dos receptores de leptina (LEPR) são obesos e hiperfágicos (Ingalls *et al.*, 1950; Clement *et al.*, 1998). A deleção de LEPR especificamente em células hipotalâmicas acarretou em fenótipo similar ao do camundongo *dbdb* (Ring e Zeltser, 2010).

Animais com deleção de LEPR ou moléculas *downstream* ao receptor como STAT3 e PI3K em neurônios AgRP e POMC mostraram resposta atenuada ao efeito anorexigênico da leptina (Gong *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2008; Van De Wall *et al.*, 2008). Camundongos com deleção de LEPR em neurônios do ARC mostraram diminuição de atividade locomotora, temperatura e gasto energético (Coppari *et al.*, 2005; Kievit *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2008; Mesaros *et al.*, 2008; Van De Wall *et al.*, 2008; Al-Qassab *et al.*, 2009). Adicionalmente, a deleção de LEPR em neurônios do VMH levou ao desenvolvimento de obesidade e diminuição drástica de gasto energético em modelos animais (Dhillon

et al., 2006; Bingham *et al.*, 2008). Conjuntamente, esses dados revelam que a sinalização hipotalâmica da leptina é crucial para sua ação no metabolismo energético.

Uma vez secretada na circulação sanguínea, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica e entra no sistema nervoso central. Ao atingir o hipotálamo, a sinalização da leptina se inicia pela ligação a forma longa do seu receptor, que é ativado e conduz o recrutamento da *Janus kinase 2* (JAK2), que fosforila o LEPR. A proteína *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) se liga ao LEPR ativado e é fosforilado pela JAK2. A fosforilação da STAT3 causa a formação de dímeros e a transloca para o núcleo celular, onde modula a transcrição dos genes *AgRP* e *POMC* que reduzem a ingestão alimentar e aumentam o gasto energético.

É descrito que as vias de sinalização intracelular de insulina e leptina possuem alvos em comum no hipotálamo (Kim *et al.*, 2000). Em neurônios hipotalâmicos, a leptina causa a fosforilação da via (IRS)/PI3K através da fosforilação de IRS pela proteína JAK2 (Niswender *et al.*, 2001). Adicionalmente, a inibição farmacológica da PI3K, por meio da administração de LY294002 ou *wortmannin* por injeções intracerebroventriculares (ICV), reduziu o efeito anorexigênico da leptina em ratos, sugerindo que a via PI3K tem um papel central no controle da ingestão alimentar mediado por este hormônio (Niswender *et al.*, 2001; Niswender, Gallis, *et al.*, 2003; Niswender, Morrison, *et al.*, 2003).

Em condições fisiológicas, neuropeptídeos orexigênicos como neuropeptídeo Y (NPY) e AgRP tem sua expressão reduzida a partir da estimulação de insulina ou leptina. Em contraste, neuropeptídeos anorexigênicos como α -melanocyte stimulating hormone (α MSH) produzido por neurônios do tipo POMC tem sua liberação aumentada pelos hormônios descritos (Morton e Schwartz, 2001; Kim *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 2006; Pardini *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2008; Belgardt e Bruning, 2010).

As CLKs (Cdc2-like kinases) são uma família de proteínas amplamente expressas em diferentes tecidos e evolutivamente conservadas em eucariotos. Em geral, foram relacionadas ao *splicing* alternativo ao induzir a fosforilação de domínios SR de fatores de transcrição (Duncan *et al.*, 1998)

Os níveis proteicos de CLK2 são regulados por jejum seguido de realimentação, e sua atividade é induzida por insulina de maneira dependente da via PI3K/AKT em fígado de camundongos e cultura de hepatócitos. A fosforilação de CLK2 no sítio treonina 343 (CLK2^{Thr343}) foi mostrada como crucial para aumentar sua atividade quinase e, assim, contribuir na supressão da transcrição de genes responsáveis pela gliconeogênese hepática, auxiliando o controle glicêmico do organismo (Nam *et al.*, 2010; Rodgers *et al.*, 2010).

Dentre os órgãos que auxiliam no controle do metabolismo energético, o tecido adiposo marrom (BAT) tem se tornado um elemento de destaque nos últimos anos, principalmente após a descoberta deste tecido ativo em seres humanos adultos (Lee *et al.*, 2016). O BAT é caracterizado por apresentar grande número de mitocôndrias e expressão da proteína *uncoupling protein 1* (UCP-1), indispensáveis para o processo de termogênese. A termogênese é o processo biológico pelo qual o organismo controla a homeostase térmica podendo ser ativado pela exposição ao frio e também induzido por alimentação (Lage *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016).

A termogênese é desencadeada através do desacoplamento da respiração mitocondrial da produção de ATP, mediada pela proteína UCP-1, que é encontrada na membrana mitocondrial interna. Utilizando-se do transporte de elétrons gerado pela oxidação dos ácidos graxos, a UCP-1 permite o retorno dos prótons para a matrix mitocondrial, evitando a produção de ATP e aumentando a dissipação de energia como calor.

A estimulação simpática através da liberação de noradrenalina nos terminais nervosos do BAT acarreta na ativação dos receptores adrenérgicos, principalmente os do tipo β_3 , que leva a ativação,

respectivamente, das proteínas de *adenylate cyclase* (AC) e *protein kinase A* (PKA), após aumento do cAMP intracelular. A proteína PKA, por sua vez induz a lipólise, com consequente aumento dos níveis de ácidos graxos livres. Os ácidos graxos são transportados para mitocôndria, onde são oxidados e formam NADH e FADH, que são oxidados pela cadeia transportadora de elétrons. Os prótons são forçados a entrar novamente na matriz mitocondrial através da UCP-1, e este retorno dos prótons libera energia, dissipada em forma de calor (Contreras 2014) O hipotálamo pode controlar a termogênese através de sinais neurais do sistema nervoso simpático, induzindo ou reprimindo este processo (Waterson e Horvath, 2015).

Recentemente, Hatting e colaboradores demonstraram que a CLK2 é expressa no BAT e que sua atividade aumentava a partir da realimentação após jejum prolongado. Camundongos com deleção de CLK2, especificamente no BAT, desenvolveram fenótipo obeso. Esse fenótipo foi decorrente, pelo menos em parte, da diminuição da capacidade termogênica durante o jejum intermitente com dieta hiperlipídica. Adicionalmente, estes animais apresentaram diminuição do consumo de oxigênio e dos níveis proteicos de UCP-1 no BAT. Portanto, nesse estudo, sugere-se que a CLK2 expressa no BAT participa da regulação da termogênese (Hatting *et al.*, 2017).

Em conjunto, considerando as evidências aqui apontadas, a hipótese deste trabalho consiste na ideia de que a CLK2 pode ser um alvo para a ação de insulina e leptina também no hipotálamo, contribuindo para a regulação da homeostase energética. Sendo assim, nossos objetivos convergiram para a investigação da expressão, regulação e função da CLK2 hipotalâmica no metabolismo energético em camundongos. Para tanto, utilizamos ensaios de ganho ou perda de função hipotalâmica de CLK2.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a expressão e regulação da proteína quinase CLK2 no hipotálamo em resposta a insulina e leptina e seu possível papel no controle do metabolismo energético.

Objetivos específicos

Avaliar a expressão da proteína CLK2 em neurônios do hipotálamo de camundongos saudáveis e obesos por dieta hiperlipídica;

Avaliar a fosforilação em treonina 343 da proteína CLK2 no hipotálamo de camundongos saudáveis e obesos por dieta hiperlipídica frente a realimentação após jejum prolongado e, em resposta aos hormônios insulina e leptina injetados por via intracerebroventricular;

Investigar a função da proteína CLK2 no hipotálamo em relação a parâmetros ligados ao controle do metabolismo energético, utilizando-se estratégias de inibição e super expressão desta proteína no hipotálamo;

Investigar alterações o metabolismo de glicose hepático em modelos animais em que a expressão de CLK2 está reduzida ou aumentada no hipotálamo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas, registrado pelo número CEUA: 2726-1 (Anexo A). Camundongos machos Swiss, *db/db* (Leprdb/Leprdb/db) e Leprdb+ com 8 semanas de idade foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). Os camundongos $CLK2^{flox/flox}$ foram gentilmente cedidos pelo Professor Pere Puigserver do Departamento de Biologia Celular do Dana Farber Cancer Institute/ Harvard Medical School e mantidos no biotério do Beth Israel Medical Deaconess Center /Harvard Medical School sob as regras do “Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” do Instituto Nacional de Saúde Americano e aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e uso de Animais de Laboratório do Beth Israel Medical Deaconess Center/Harvard Medical School.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas individuais e em ambiente livre de patógenos específicos, com temperatura controlada a 20°C e ciclos de claro/escuro de 12h cada. Os animais receberam, *ad libitum*, dieta padrão (Nuvilab) ou dieta hiperlipídica, essa última contendo 60% de lipídeos em sua maioria ácidos graxos saturados. Os animais foram alocados em grupos distintos de maneira pareada com o peso corporal. As medidas de ingestão alimentar eram conduzidas entre 8:00h e 10:00h. O tempo de jejum *overnight* adotado foi de 12-14h e jejum prolongado foi de 24h.

1. Cirurgias

Foram executadas cirurgias estereotáxicas com os animais anestesiados com Cetamina (80 mg/kg) (Syntec, Brasil) e Xilazina (10 mg/kg) (Syntec, Brasil), administradas por via intraperitoneal. Quando

anestesiados, os animais eram posicionados no aparelho estereotáxico (Ultra Precise/model 963, Kopf, Alemanha). Após uma incisão no crânio foi possível visualizar a sutura Bregma e, a partir desta, foram utilizadas coordenadas obtidas do Atlas Paxinos de acordo com a região do sistema nervoso central a ser investigada.

1.1. Implantação de cânula no ventrículo lateral

Para a implantação de uma cânula de aço-inox (26 gauge, Plastics One) no ventrículo lateral direito, foram utilizadas as seguintes coordenadas: anteroposterior (AP): -0,34 mm ; lateral (L): -1,0 mm e dorsoventral (DV): -2,2 mm. A cânula foi fixada ao crânio dos animais com o uso de resina e, após a cirurgia, os mesmos receberam analgésico via oral por 5 dias (paracetamol) na dose de 305 mg/kg. A confirmação da posição da cânula foi feita por meio de injeção intracerebroventricular (ICV) de angiotensina II, que induz efeito dipsinogênico. Os animais que responderam positivamente ao teste de angiotensina II foram incluídos nos experimentos posteriores.

1.2. Implantação de mini bomba osmótica acoplada a cânula para infusão contínua no ventrículo lateral

Nesse tipo de cirurgia, a cânula que foi implantada no ventrículo lateral do animal (as coordenadas foram descritas acima) e acoplada a um sistema de infusão contínua que consistia de uma mini bomba osmótica (Alzet 1007D-DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) programada para a infusão de um volume médio de 0,5 ul/h por 7 dias. A ligação entre a cânula e a mini bomba foi feita por um cateter, a cânula foi fixada com resina no crânio dos animais e a pele ao redor da incisão foi suturada.

1.3. Injeções de vetores virais no hipotálamo mediobasal (MBH) e núcleo central da amígdala (CeA) dos camundongos.

Nesse outro experimento, foram utilizadas as seguintes coordenadas com o objetivo de atingir o MBH: AP: -1,3 mm ; L: $\pm$ 0,5 mm; DV: -5,7 mm; e para atingir o CeA, foram utilizadas as seguintes coordenadas: AP: -1,5 mm ; L: $\pm$ 1,3 mm; DV: -5,8 mm. A injeção de 150 μ l de adenovírus ou adenovírus associado foi executada bilateralmente com auxílio de uma micropipeta de vidro e um sistema de injeção de ar pressurizado (Minokoshi et al., 2004). A incisão foi suturada com fio de sutura. Somente os animais que apresentaram expressão de GFP no MBH ou no CeA foram incluídos no estudo.

2. Avaliação de sensibilidade a insulina e leptina

Os animais submetidos a avaliação da sensibilidade a insulina e leptina estavam sob jejum *overnight* antes das injeções que serão descritas abaixo:

2.1. Os testes realizados nos camundongos Swiss, foram realizados pela injeção de 2 μ L por animal de insulina (1 μ g/ μ L)(Humulin, Lilly) ou 2 μ L de leptina (5 ng/ μ L)(Calbiochem) ou 2 μ L de solução fisiológica 0,9% (como controle) por via ICV. A ingestão alimentar foi mensurada após 4 horas do início das injeções ICV. Para experimentos terminais, os animais foram sacrificados e tiveram seus tecidos dissecados após 15 minutos do início das injeções ICV.

2.2. Os testes realizados nos camundongos que receberam injeção de adenovírus associado, foram realizados pela injeção intraperitoneal (IP) de leptina na dose de 3 mg/kg de peso corporal. Após a injeção de leptina, a ingestão alimentar foi medida 2; 4; 8 e 24 horas. O peso corpóreo foi mensurado antes e depois de 24 horas da injeção. Para experimentos terminais, os animais foram sacrificados e tiveram seus tecidos dissecados após 30 minutos do início das injeções IP.

3. Inibição farmacológica de PI3K, AKT e JAK2 no hipotálamo

Camundongos Swiss previamente canulados, receberam injeção de 2µL por via ICV dos seguintes inibidores farmacológicos: LY294002 (20µM/µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), inibidor de PI3K; AKTVIII (20µM/µL) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), inibidor de AKT ou AG490 (25µM/µL) (Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom), inibidor de JAK2. Um grupo de camundongos recebeu injeção ICV de LY294002, AKTVIII ou os dois inibidores concomitantemente, e após 1 hora receberam injeção ICV de insulina. Um outro grupo de camundongos canulados recebeu injeção ICV de AG490, LY294002 ou os dois inibidores concomitantemente, e após 1 hora receberam injeção ICV de leptina. Após 15 minutos os animais foram sacrificados para retirada do hipotálamo e posterior estudo da fosforilação de CLK2 por *Immunoblotting*.

4. Inibição farmacológica e *knocking down* de CLK2 no hipotálamo

Camundongos Swiss previamente canulados foram divididos em dois grupos e tratados com inibidor farmacológico de CLK2, TG003 (60 µM em 2µl) (Merck, Darmstadt, Alemanha) ou veículo (DMSO 0,3%) por via ICV durante 7 dias consecutivos, duas vezes ao dia. Um outro grupo de camundongos foi submetido a implantação de cânula no ventrículo lateral acoplada a mini bomba osmótica para infusão contínua durante 7 dias de siRNA (*Small interference RNA*) para bloquear a expressão de CLK2 (siCLK2) ou siRNA *scramble* (siSCR) (2ng por dia) que não possuía atividade biológica (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

As sequências utilizadas foram: siCLK2 (5' phos/GUAUUCAUAGGACUGC 3') siSCR (5' phos/UCGGCAGUCCUAUG 3'). Foram adicionados dois grupos como controle, um grupo de animais que foram somente submetidos a cirurgia e outro com infusão contínua de salina. Nenhum destes grupos apresentou nenhuma alteração quando comparados ao grupo siSCR.

A ingestão alimentar e peso corporal foram mensurados diariamente. Em um grupo experimental foi avaliada a ingestão alimentar 4 horas após injeção ICV de insulina ou leptina ou salina. O consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono para posterior cálculo do quociente respiratório foram mensurados no sexto dia de tratamento. E então, após 24h de jejum, os animais foram sacrificados e o hipotálamo foi dissecado para posterior avaliação de expressão gênica de *clk2* e neuropeptídeos e *immunoblotting* de CLK2. Também foram dissecados, os tecidos adiposos brancos para medida da massa, BAT para análise da expressão proteica de UCP-1, e fígado para análise da expressão proteica de PEPCK ou expressão gênica de PEPCK, G6Pase e glicoquinase.

Um grupo experimental adicional foi submetido a jejum prolongado (24 horas) e realimentação após tratamento ICV com TG003 ou veículo por 7 dias para avaliação da fosforilação hipotalâmica de CLK2 em resposta à insulina ou leptina ou salina.

5. Superexpressão de CLK2 no hipotálamo mediobasal

5.1. Construção de adenovírus recombinantes utilizando sistema Adeno-X: Com o intuito de super expressarmos a proteína CLK2 no hipotálamo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou com *db/db*, que possuem uma mutação natural do receptor de leptina, utilizamos adenovírus recombinantes não-replicativos como vetores para modificar a expressão proteica das células nervosas *in vivo*.

O gene da CLK2 foi clonado no vetor pShuttle (Figura 1). Em seguida, após o teste da expressão, os adenovírus recombinantes foram construídos conforme metodologia do Adeno-X Expression Kit® (Clontech®), esquematizado na Figura 2. Adenovírus recombinantes para a superexpressão de GFP foram construídos para serem usados como controles.

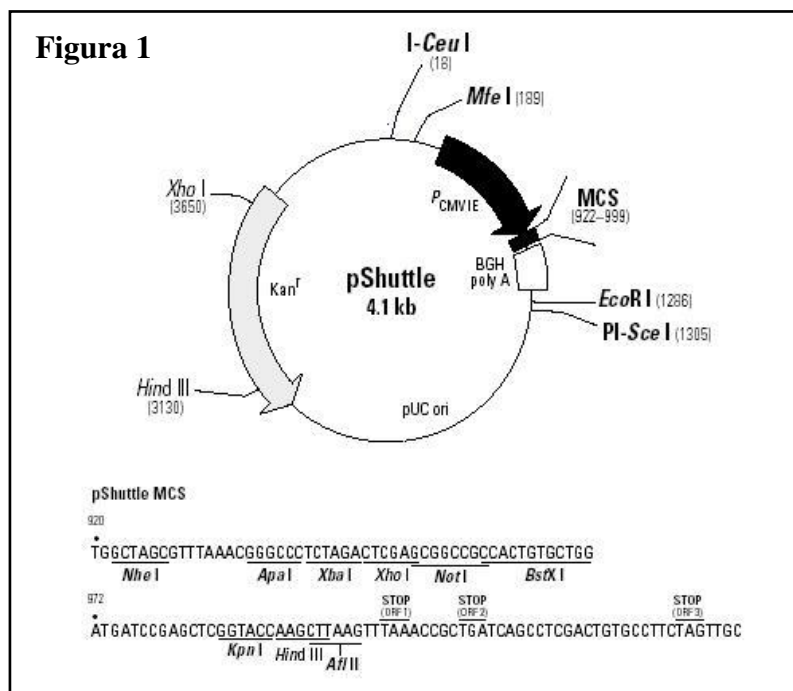


Figura 1. Mapa do vetor pShuttle (Clontech). Esquema da construção do vetor onde gene CLK2 foi clonado para obtenção do adenovírus recombinante.

5.2. Produção e purificação por gradiente de césio de adenovírus recombinantes: Para a produção dos vetores adenovirais, células HEK293 foram cultivadas em 20 garrafas de 75 cm² e infectadas com os vetores de interesse e, após a completa destruição da monocamada de células (cerca de 72 horas após a infecção), o meio de cultura contendo as células foi coletado e centrifugado a 3.000 x g por 10 min. O sobrenadante (meio de cultura sem células) foi guardado e o precipitado de células foi ressuscitado em 5 mL de Tris-HCl (10 mM, pH 8,0). Com essa suspensão de células foram feitos 3 ciclos de congelamento em mistura de gelo seco e etanol, e

descongelamento em banho a 37 °C, com a finalidade de romper as membranas das células e liberar as partículas virais que ainda estivessem dentro das células. Esse material foi centrifugado a 3.000 x g por 10 min e o sobrenadante coletado. Com o sobrenadante da primeira centrifugação (meio de cultura) foi feita uma ultracentrifugação a 27.000 r.p.m por 3 horas a 4 °C, a fim de coletar as partículas virais presentes no meio, e o precipitado foi ressuspensionado com o sobrenadante das células rompidas por congelamento e descongelamento. Essa solução foi nomeada como *overlay* usado no gradiente de césio descrito a seguir.

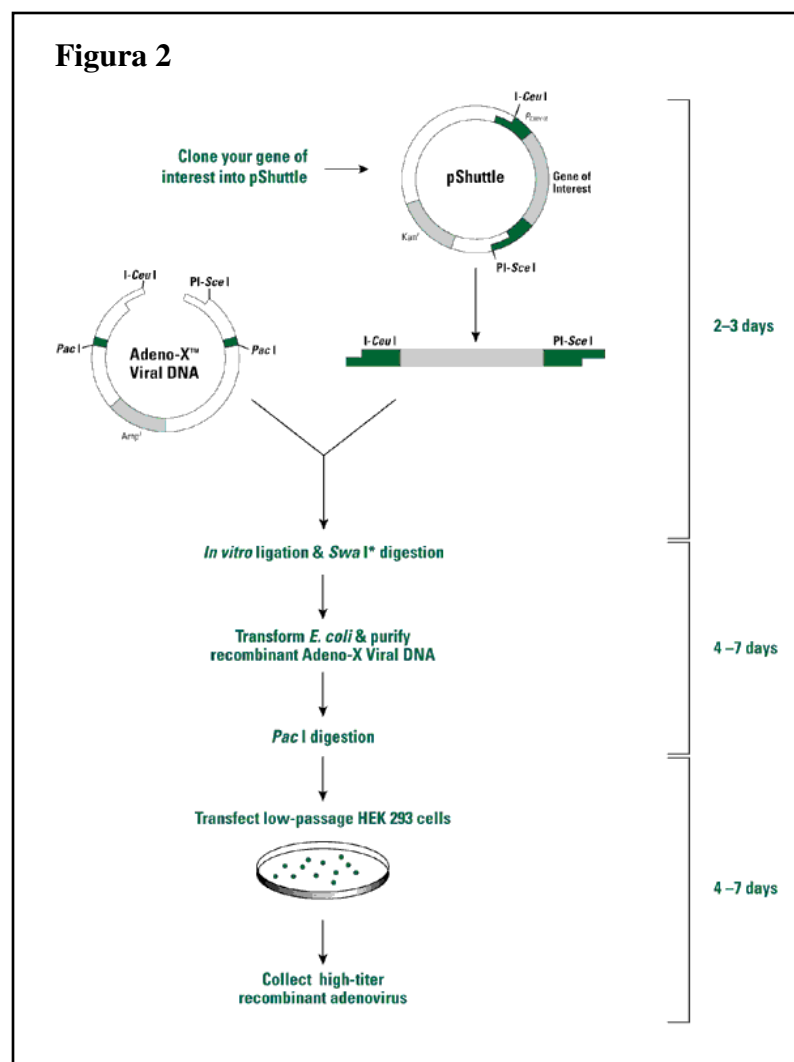


Figura 2. Construção de adenovírus recombinantes segundo o Adeno-X Expression Kit (Clontech).
Workflow utilizado para a obtenção do adenovírus recombinante.

O gradiente de césio foi montado em tubos de 11,5 mL da seguinte forma: 2,5 mL de solução A (CsCl em água na densidade de 1,4 g/mL), 2,5 mL de solução B (CsCl em água na densidade de 1,25 g/mL) e 5 mL de *overlay*. Os tubos foram balanceados, selados e centrifugados a 35.000 r.p.m. por no mínimo 16 horas. A banda de vírus formada foi então coletada com o auxílio de uma seringa e o volume coletado foi colocado em câmaras de diálise (Pierce®). A diálise foi executada sob agitação por 1 hora a 4 °C, em tampão de diálise (10 mM Tris-HCl; 2 mM MgCl₂; 5 % de sacarose). Após esse período, o tampão foi trocado e o procedimento repetido por mais 3 vezes, sendo então o concentrado de vetores adenovirais coletado, separado em alíquotas e guardado a -70 °C.

5.3. Titulação dos adenovírus recombinantes (ensaio de placa): Os adenovírus produzidos e purificados em gradiente de césio foram analisados por PCR quanto à presença dos genes de interesse e a concentração de ambos foi estimada por ensaio de formação de placas. Para tanto, células HEK293 foram semeadas em placas de 60 mm e infectadas com os adenovírus diluídos de 1:10-5 a 1:10-10. Após a infecção, as células foram cobertas com DMEM contendo 2% de SFB e 0,5% de UltraPure Low Melting Point Agarose (Invitrogen®) e incubadas por 7 dias. Após esse período, as células foram fixadas com formalina 4% (em solução salina contendo 0,15 M NaCl) por 30 min e coradas com Cristal Violeta (0,1% em água contendo 2% de etanol) por 5 min. Por fim, as células foram lavadas com água e as placas (regiões sem células) resultantes do efeito citopático dos vetores adenovirais foram contadas.

6. Deleção de CLK2 no hipotálamo mediobasal e no CeA

Animais CLK2^{flox/flox} foram submetidos a injeção dos adenovírus AAV2/9-Cre-ires-eGFP ou seu controle AAV2/9-ires-eGFP (Ohio University Viral Vector Facility, Ohio, EUA) com o objetivo de deletar a expressão da proteína CLK2 no hipotálamo mediobasal ou no núcleo central da amígdala.

Após a recuperação, o peso corporal foi mensurado semanalmente. Na décima segunda semana após a deleção, um grupo de animais foi submetido a medida de ingestão de 24 horas, avaliação de composição corporal por ressonância magnética e, logo no dia seguinte, colocados em jejum overnight para a injeção intraperitoneal de leptina (3mg/Kg) e subsequente medida de ingestão alimentar. Outro grupo de camundongos foi submetido aos testes de tolerância a glicose e de insulina e, após jejum de 24 horas, foram sacrificados para posterior avaliação de neuropeptídeos hipotalâmicos e marcadores de gliconeogênese no fígado e termogênese no tecido adiposo marrom.

7. Respirimetria indireta

O consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono foram medidos através de um sistema de circuito aberto computadorizado (Oxymax Deluxe System; Columbus Instruments, Columbus, OH). Antes da medição, animais alimentados foram aclimatados nas caixas do equipamento por um período de 24 horas. O cálculo do quociente respiratório (RER) foi realizado ao término do procedimento.

8. Teste de tolerância ao piruvato

O teste de tolerância ao piruvato foi realizado após jejum *overnight* dos animais. Uma injeção intraperitoneal de piruvato dissolvido em PBS foi aplicada nos animais na dose de 2 g/kg de peso corporal. A glicemia foi verificada coletando-se sangue da ponta da cauda por meio de fitas reativas e glicosímetro nos tempos: 0 (basal) 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de piruvato.

9. Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi realizado após jejum de 6 horas. Uma injeção intraperitoneal de insulina dissolvida em salina foi aplicada nos animais na dose de 1,5 UI/kg de peso corporal. A

glicemia foi verificada, coletando-se sangue da ponta da cauda, por meio de fitas reativas e glicosímetro nos tempos: 0 (basal) 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção de insulina.

10. Teste de tolerância à glicose

Os animais foram submetidos a jejum *overnight* e uma injeção intraperitoneal de glicose 20% na dose de 2 g/kg de peso corporal foi administrada. A glicemia foi verificada coletando-se sangue da ponta da cauda, por meio de fitas reativas e glicosímetro nos tempos: 0 (basal) 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a injeção de glicose.

11. Composição corporal

Os camundongos foram submetidos a análise de composição corporal através de imagens de ressonância magnética no equipamento EchoMRI® (Echo Medical System, Houston, EUA) imediatamente após pesagem.

12. Dissecção de núcleos hipotalâmicos

Os animais foram sacrificados e cada região do hipotálamo foi dissecada a partir de 1 mm de espessura da secção sagital do cérebro recém extraído, utilizando uma matriz de aço-inox Stoelting Co. (Wood Dale, Illinois, EUA) e lâminas Cadence Inc. (Staunton, VA, EUA). Os núcleos hipotalâmicos: arqueado (ARC), ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH) e paraventricular (PVN) foram dissecados a partir da primeira secção da linha média do cérebro e o hipotálamo lateral (LH) foi dissecado a partir da segunda secção da linha média do cérebro (Minokoshi *et al.*, 2004). Após as dissecções, as amostras foram congeladas a -80oC para posterior processamento e obtenção de extrato total de proteínas para *Immunoblotting* como será descrito abaixo.

13. Imunoprecipitação e *Immunoblotting*

13.1. Extração de Proteínas: O tecido extraído foi imediatamente colocado em tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM ortovanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetanossulfonila e 0.1 mg/mL aprotinina) a 4 °C e homogeneizado com TissueLyser (QIAGEN®). O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm a 4 °C por 40 minutos para remoção de material insolúvel. O sobrenadante foi utilizado para a análise por extrato total ou para imunoprecipitação com anticorpos específicos. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Biureto. O volume das amostras foi normalizado por concentração protéica.

13.2. *Immunoblotting*: As proteínas foram ressuspensas em tampão de Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970), contendo 100 mM de DTT. Após aquecimento a 100°C por 10 minutos, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). O gel foi balizado por marcador de peso molecular conhecido da Bio Rad. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com tampão de corrida para eletroforese (Tris base 200mM; Glicina 1,52M; EDTA 7,2mM; SDS 0,4%). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD banhadas com tampão de transferência durante 60 minutos a 120 Volts sob gelo (Tris 25mM; Glicina 192mM; Metanol 20%; SDS 0,02%). As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Após lavadas em solução basal (Tris 25mM; NaCl 0,05M; Tween 20 0,02%), estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos, mantidas a 4 °C, *overnight*, sob agitação contínua. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com solução basal e a detecção das bandas foi realizada utilizando anticorpo secundário ligado à uma molécula de peroxidase, que reagiu à solução de

quimioluminescência (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. As membranas sofreram exposições a filmes de RX, posteriormente reveladas, sendo as bandas identificadas na autoradiografia e quantificadas através de densitometria óptica. Posteriormente, analisadas pelo software UN-SCAN-IT™ 6.0. Ou então, as membranas após a quimioluminescência, foram colocadas numa fotodocumentadora BioRad (Gel Doc™ XR, BioRad), gerando arquivos digitais e posteriormente as imagens foram analisadas no programa ImageLab (BioRad).

13.3. Imunoprecipitação: Após a obtenção do extrato proteico e determinação a concentração protéica de cada amostra, o volume foi normalizado para a concentração protéica desejada e as amostras foram incubadas com anticorpo anti-CLK2 por 12 horas a 4°C sob agitação contínua. A seguir, foram acrescentados 60 uL de proteína A-Sepharose 6MB para precipitação do complexo proteína A com o anticorpo, mantida sob agitação contínua por duas horas. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 11.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado três vezes com solução tampão específica (2 mM de Ortovanadato de Sódio; 100 mM Trisma; 1 mM EDTA e 0,5% Triton X-100). A seguir, as proteínas precipitadas foram acrescidas de tampão de Laemmli, contendo 100 mM de DTT e aquecidas a 100 °C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE) e foi realizada a mesma sequência de etapas descritas acima para *immunoblotting*.

14. Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente e a perfusão foi executada, utilizando-se bomba de infusão a uma taxa de infusão de 5 mL/minuto com solução fixadora, contendo formalina tamponada (4%). Após a pós-fixação de 24 horas em tampão contendo formalina (4%) e sacarose (20%), os cérebros foram submetidos a cortes histológicos em micrótomo de congelamento

na espessura de 35 μm . Os cortes foram alocados em placas de petri e submetidos a lavagem com tampão KPBS (NaCl 137 mM; Fosfato 10 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,4). Foram então bloqueados com soro normal *donkey* a 3% por uma hora, seguida de incubação com anticorpo primário *overnight*, anti-CLK2 (1:150; Santa Cruz technology), anti-antígeno nuclear neuronal (NeuN; 1:1000; millipore, Billerica, MA, EUA) ou anti-proteína fibrilar glial (GFAP; 1:1000; Millipore, Billerica, MA, EUA).

Para a confirmação da marcação do anticorpo anti-CLK2, foi executada um teste de pré-adsorção do anticorpo anti-CLK2 (1:150; 6,7 $\mu\text{g/mL}$) pré incubado com o peptídeo sintético CLK2 (sc-74912P, Santa Cruz Biotechnology; 6,7 $\mu\text{g/mL}$). Um controle positivo foi executado em paralelo, sendo utilizado anticorpo anti-CLK2 sem prévia adsorção. Subsequentemente, os cortes passaram por lavagem com tampão KPBS e os cortes foram submetidos à incubação com anticorpo secundário alexa-Fluor conjugado com fluoróforo por duas horas (1:500; Jackson Laboratories, bar harbor, ME, EUA), e montados em lâminas gelatinizadas. Após secagem, as lâminas foram montadas com meio de montagem (DPX-Sigma) e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axioimager A1, Zeiss, Munique, Alemanha).

15. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

15.1. Extração de RNA e síntese de cDNA: Os tecidos foram submetidos à extração de RNA conforme protocolo do reagente TRIzol ® Life Technology (Grand Island, NY, EUA), sendo em seguida quantificado e armazenado em -80°C . Para a síntese de cDNA utilizamos 1 μg de RNA para cada reação com o kit “High Capacity RNA-to-cDNA” (Applied Biosystems, Carlsbad, California, EUA).

15.2 PCR em tempo real: As reações de PCR em tempo real foram realizadas pelo sistema TaqMan™ Applied Biosystems (que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com

um fluoróforo) e utilizamos 100ng de cDNA por reação. Os primers utilizados foram: CLK2, Mm00432578_m1; NPY, Mm00445771_m1; POMC, Mm00435874_m1; AgRP, Mm00475829_g1, CRH, Mm01293920_s1; PEPCK, Mm01247058_m1; G6Pase, Mm00839363_m1; Glicoquinase, Mm00439129_m1; UCP-1, Mm01244861_m1; PGC-1 α , Mm01208835_m1 e PRDM-16, Mm00712556_m1 da Applied Biosystems (Carlsbad, California, EUA). Para a quantificação relativa do gene de interesse, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix Applied Biosystems (Carlsbad, California, EUA); 2x 0,625 μ L da solução de primers e sonda, 1,625 μ L de água DEPC e 4,0 μ L de cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa aos controles endógenos (GAPDH, 36B4 ou beta-actina) foram obtidos pela análise dos resultados no programa DatAssist3.01 Software Applied Biosystems (Carlsbad, California, EUA).

16. Análise estatística

Os dados foram expressos como médias $\pm$ erro-padrão da média, sendo indicado o número de experimentos independentes. Para análise estatística, as médias dos grupos foram comparadas com teste t de Student (two tailed) ou One way/Two way ANOVA, onde foi necessário, utilizando-se do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO 1

ORIGINAL ARTICLE

Cdc2-like kinase 2 in the hypothalamus is necessary to maintain energy homeostasis

PGF Quaresma^{1,2}, L Weissmann^{1,2}, TM Zanotto^{1,2}, AC Santos², AHB de Matos³, IC Furigo⁴, FM Simabuco⁵, J Donato Jr⁴, JC Bittencourt⁴, I Lopes-Cendes³ and PO Prada^{1,2,5}

OBJECTIVE: To investigate whether the Cdc2-like kinase 2 (CLK2) is expressed in hypothalamic neurons and if it is, whether the hypothalamic CLK2 has a role in the regulation of energy balance.

SUBJECTS: Swiss mice on chow or high-fat diet (HFD) and *db/db* mice on chow diet were used to address the role of CLK2 in the hypothalamus.

RESULTS: Hypothalamic CLK2^{Thr343} phosphorylation, which induces CLK2 activity, is regulated *in vivo* by refeeding, insulin and leptin, in a PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-dependent manner. The reduction of CLK2 expression in the hypothalamus, by chronic pharmacological inhibition with TG003 or by chronic knockdown with small interfering RNA was sufficient to abolish the anorexigenic effect of insulin and leptin, to increase body weight, fat mass, food intake and to decrease energy expenditure in mice on chow. In contrast, CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus in response to insulin, leptin or refeeding was impaired in mice on HFD or in *db/db* mice. Chronic CLK2 inhibition in the hypothalamus was associated with a slight increase in the fasting blood glucose levels, reduction in PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) expression in the liver and enhanced glucose production from pyruvate, suggesting a regulation of hepatic glucose production. Further, overexpressing CLK2 in the mediobasal hypothalami of mice on HFD or in *db/db* mice by adenovirus partially reversed the obese phenotype.

CONCLUSIONS: Thus, our results suggest that protein CLK2 integrates some important hypothalamic pathways, and may be a promising molecule for new therapeutic approaches for obesity and diabetes.

International Journal of Obesity (2017) 41, 268–278; doi:10.1038/ijo.2016.174

INTRODUCTION

The hypothalamus has an important role in the regulation of whole-body energy homeostasis.¹ Insulin and leptin are potent anorexigenic hormones, largely because of their effects on the hypothalamic nuclei. Insulin acts through the insulin receptor, activating phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway decreasing neuropeptide Y (NPY) and Agouti-related protein (AgRP) gene expression, which are potent orexigenic neuropeptides.² In addition, insulin alters the electrical activity and the localization of forkhead box O1 (FoxO1) in proopiomelanocortin (POMC) neurons. Those actions on melanocortin system are at least, in part, responsible for the anorexigenic effect of insulin.^{1–7} Leptin recruits Janus kinase 2 (JAK2) to the leptin receptor, which binds to signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) proteins, and are themselves phosphorylated by JAK2. In turn, STAT3 enhances transcription of POMC gene leading to a reduction on food intake.^{8,9} Besides, it is known that leptin and insulin may share common intracellular signals in the hypothalamus.¹⁰ Leptin is also able to activate PI3K via JAK2 phosphorylation² contributing to the regulation of food intake and energy expenditure.^{4,11–13}

Cdc2-like kinase 2 (CLK2) is an evolutionary conserved family of LAMMER kinase, found in most of eukaryotes.^{14,15} It was recently shown to have a crucial role regulating gluconeogenesis and fatty acid oxidation in the liver.^{16,17} Hepatic CLK2 is activated in

response to refeeding after prolonged fasting, and also is activated by insulin signaling, more specifically via AKT phosphorylation.^{16,18} The phosphorylation of threonine 343 (Thr343) site of CLK2 has been shown to be the major regulator of CLK2 activity.¹⁶ CLK2^{Thr343} phosphorylation induces PGC-1 α phosphorylation in the liver, which represses gluconeogenesis machinery and hepatic glucose production.¹⁶ In *db/db* mice, which present elevated gluconeogenic activity in the liver, CLK2 is downregulated and overexpressing CLK2 specifically in this tissue was able to suppress the gluconeogenic activity almost to the same levels of control mice. Those findings suggested that the inhibition of CLK2 activity in the liver of *db/db* mice might contribute to the hyperglycemia observed in these mice^{16,18} and that CLK2 has a crucial role in the liver regulating hepatic glucose production.

By analogy, one could argue that CLK2 may be expressed in the hypothalamus and may have a role controlling energy homeostasis through insulin signaling. For this purpose, we aimed to investigate whether CLK2 is expressed in the hypothalamic nuclei and whether hypothalamic CLK2 is part of insulin and leptin signaling and action. We also aimed to investigate the physiological role of CLK2 in the hypothalamus in terms of energy and glucose homeostasis regulation. In addition, we investigated whether obese mice, either those on high-fat diet or *db/db* had a reduction of CLK2 activation in the hypothalamus and whether

¹Department of Internal Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil; ²Department of Medical Clinics, Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil; ³Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil; ⁴Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil and ⁵School of Applied Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil. Correspondence: Professor PO Prada, School of Applied Sciences, University of Campinas —UNICAMP—Rua Pedro Zaccaria, 1300 - Jd. Sta Luiza, Limeira, São Paulo 13484-350, Brazil.

E-mail: pprada@fcm.unicamp.br or pprada.fca@gmail.com

Received 11 January 2016; revised 21 August 2016; accepted 9 September 2016; accepted article preview online 13 October 2016; advance online publication, 20 December 2016

the overexpression of CLK2 in their mediobasal hypothalami was able to reverse the obese phenotype of these mice.

MATERIALS AND METHODS

All experiment protocols were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas. Eight-week-old male Swiss, *db/db* mice (*Leprdb/Leprdb*) and *Leprdb/+* mice obtained from the University of Campinas, São Paulo, receiving a standard rodent chow or a high-fat diet (HFD) *ad libitum* as previously described.^{19,20} Animals were allocated in groups by paired weight. All feeding tests were conducted between 0800 AM and 1000 AM.

Surgeries

We performed surgeries for intracerebroventricular (ICV) cannula implantation and intrahypothalamic injections in mice as described before.²¹ Animals that did not reach this criterion were excluded from the experiments. Intrahypothalamic injection, reached the mediobasal hypothalamus (MBH), arcuate nucleus, ventromedial/dorsomedial hypothalamus following coordinates: anterior/posterior: 1.30 mm, lateral: ± 0.5 mm and dorso/ventral: -5.70 mm. The injections (150 nl: adenovirus 6×10^6 pfu per side) were performed bilaterally using a glass micropipette air pressure injection system.²² After 2 days of recovery, we started measuring body weight (BW) and food intake (FI) for 7 consecutive days. At day 8, energy expenditure was recorded, followed by deeply anesthesia and perfusion immunofluorescence in order to confirm the sites of injections or hypothalami were collected to perform CLK2 relative expression by real-time PCR. Only mice-expressing green fluorescent protein (GFP) in the MBH were considered for the experiments.

Insulin and leptin sensitivity

Overnight fasted mice received injections via: (1) ICV of insulin (human recombinant insulin; Eli Lilly and Co. Indianapolis, IN, USA) or leptin (Calbiochem, San Diego, CA, USA); (2) intraperitoneal (i.p.) of leptin (3 mg kg^{-1} BW). Hypothalami were dissected after 15 min for ICV and 30 min for i.p. injections for further studies.

CLK2 inhibition

We used TG003 (Merck, Darmstadt, Germany) or vehicle (dimethyl sulfoxide, 0.3%) or small interference RNA (siCLK2) and scramble as a control (siSCR; $2 \mu\text{g}$ per day; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) infused for 7 days by ICV micro-osmotic pump Alzet 1007D (DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA). A sham group (without infusion) and another group receiving saline were run to control of side effects of infusions. We measured BW, FI daily, oxygen (O_2) consumption, carbon dioxide (CO_2) production and respiratory exchange ratio (RER), as described before²¹ at day 6 and at day 7, fasted mice were killed to dissect hypothalami, fat pads, liver and brown adipose tissue (BAT). In addition, we treated mice on chow with ICV TG003 and evaluate CLK2^{Thr343} phosphorylation after fasting and refeeding conditions.

Pyruvate test

12 h-fasted mice were injected (i.p.) with sodium pyruvate (2 g kg^{-1}) and blood samples were collected from 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min.

Hypothalamic nuclei dissection

Was done as described before.²¹

Immunoprecipitation and immunoblotting

Immunoblotting and immunoprecipitation experiments were conducted as described previously.²³ CLK2, uncoupling protein 1 (UCP-1), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and phospho-JAK2 antibodies were from Santa Cruz Technology (Dallas, TX, USA). Phospho-AKT, JAK2 and AKT antibodies were from Cell Signaling (Boston, MA, USA) and pThr343 antibody was from New England Peptide (Gardner, MA, USA).

Dual-labeled immunofluorescence

Mice were anesthetized followed the protocol described before.²⁴ For immunofluorescence, brain sections were rinsed in 0.02 M potassium phosphate-buffered saline, pH 7.4 (potassium phosphate-buffered saline),

blocked in 3% normal donkey serum (1 h), followed by an overnight incubation in antisera against CLK2 (1:150; Santa Cruz Technology), neuronal nuclear antigen (1:1000; Millipore) or glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000; Millipore, Billerica, MA, USA). To confirm specificity of the anti-CLK2 antisera, we performed a pre-adsorption test using anti-CLK2 antisera (1:150, $6.7 \mu\text{g ml}^{-1}$) pre-incubated in the immunogen blocking synthetic peptide (sc-74912P, Santa Cruz Biotechnology; $6.7 \mu\text{g ml}^{-1}$). A positive control was performed in parallel, using non-preadsorbed anti-CLK2 antisera. Subsequently, sections were rinsed, incubated (90 min) in Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:500, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) and mounted. Photomicrographs were acquired with a Zeiss Axiocam HRC camera adapted to a Zeiss Axioimager A1 microscope (Zeiss, Munich, Germany).

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA from hypothalami and real-time PCR was done following previous protocol.²³ Primers and probes sequences are detailed in figure legends.

Adenovirus production and purification

Were obtained as described previously.^{16,25}

Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ s.e.m, tested for normal distribution and equivalence of variances. Significance was determined using two-tailed Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-test, as appropriate, and differences were considered significant if $P \leq 0.05$. We used GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The sample size was adequate to the statistical tests used in the experimental conditions.

RESULTS

CLK2 is expressed in hypothalamic neurons

CLK2 immunoreactivity was observed either in hypothalamic cell bodies (Figure 1a) or in axon terminals distributed in several brain structures, such as the central nucleus of the amygdala (Figure 1b). Pre-incubation with the blocking peptide completely neutralized CLK2 staining in all brain areas (Figures 1c and d). In comparison with DAPI nuclear staining, CLK2 expression was observed in the cytoplasm and was abundantly distributed in the MBH, including the ventromedial nucleus and the arcuate nucleus (Figures 1e–g). Double immunofluorescence was performed to co-localize CLK2 with a neuronal nuclear antigen or an astroglial marker (GFAP). Although CLK2 produced a cytoplasmic labeling that showed a perfect co-localization with neuronal nuclear antigen nuclear staining in the MBH (Figures 1h–j), any co-expression between CLK2 and GFAP was observed (Figures 1k–m). Therefore, these findings indicate a robust CLK2 expression in hypothalamic neurons.

Hypothalamic CLK2 is regulated by nutritional status and by anorexigenic hormones in a PI3K-dependent manner

After prolonged fasting, CLK2^{Thr343} phosphorylation was abolished and refeeding induced a crescent CLK2^{Thr343} phosphorylation up to 4 h (Figure 2a). Insulin increased CLK2^{Thr343} phosphorylation in a dose-dependent manner. CLK2^{Thr343} phosphorylation was detectable in the hypothalamus after $0.2 \mu\text{g}$ of insulin ICV injection and the maximal stimulation was reached with the dose of $2.0 \mu\text{g}$ of insulin after 15 min of insulin injection (Figure 2b), similar to insulin pAKT induction.²¹ We also performed a time course using the $0.2 \mu\text{g}$ dose of insulin where we detected the maximal CLK2^{Thr343} phosphorylation after 15 min of injection (Figure 2c). Thus, we used the dose of $0.2 \mu\text{g}$ of insulin and dissected the hypothalamus after 15 min in all experiments, which required insulin ICV injection. Insulin was able to induce CLK2^{Thr343} phosphorylation also in multiple hypothalamic nuclei (Figure 2d). Using a co-immunoprecipitation, we demonstrated

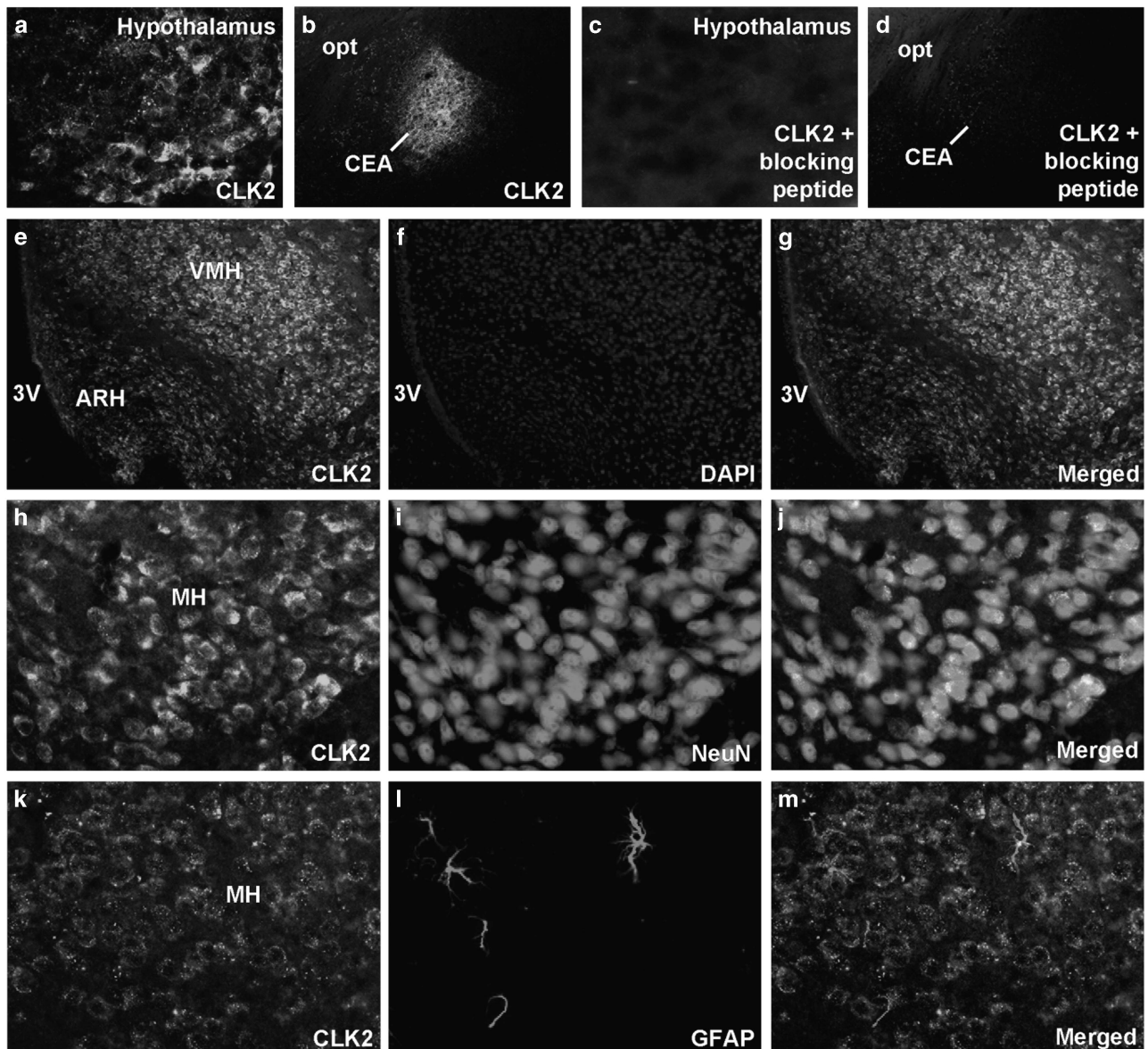


Figure 1. CLK2 is expressed in hypothalamic neurons. We used double immunofluorescence to determine the expression of CLK2 in (a) hypothalamic cell bodies and (b) central nucleus of amygdala (CEA). Specificity of the antibody against CLK2 protein was evaluated using an immunogen synthetic peptide in the hypothalamus (c) and CEA (d). CLK2 staining in the MBH, including the ventromedial nucleus (VMH) and arcuate nucleus (ARH) (e). DAPI nuclear staining in the MBH, VMH and ARH (f). Merged between CLK2 and DAPI staining (g). Double immunofluorescence to determine the expression of CLK2 (h) in neurons, by using neuronal nuclei (NeuN) as a marker (i), and merged images (j). In another set of experiments, we used double immunofluorescence to determine the expression of CLK2 (k) and in astrocytes by using GFAP as a marker (l), and merged images (m).

that there was no association between CLK2 and AKT after ICV saline injection, but after ICV insulin injection in hypothalamus of mice on chow (Figure 2e). Inhibition of PI3K or AKT by pharmacological inhibitors abolished the effect of insulin to induce CLK2^{Thr343} phosphorylation (Figure 2f). ICV leptin injection was also able to induce CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of control mice and the dose with maximum effect was 10 ng (Figure 2g). Thus, we used the dose of 10 ng of leptin in all experiments, which required leptin ICV injection. The time point where we observed the maximal CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus was after 15 min of injection (Figure 2h). Hypothalamic inhibition of PI3K or JAK2 by inhibitors, *in vivo*, reduced CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to leptin, been LY the most potent inhibitor of CLK2^{Thr343} phosphorylation in

response to leptin. Injecting the both, LY and AG490, CLK2^{Thr343} phosphorylation was abolished in response to leptin (Figure 2i). In order to investigate whether leptin via i.p. injection may recapitulate some of the refeeding or ICV leptin responses, we injected leptin via i.p. and observed a slight increase in CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of chow mice after 30 min (Figure 2j).

Chronic pharmacological inhibition of CLK2 expression in the hypothalamus alters food intake, energy expenditure and glucose metabolism

TG003-injected ICV reduced CLK2 protein expression and abolished CLK2 phosphorylation in response to insulin in the

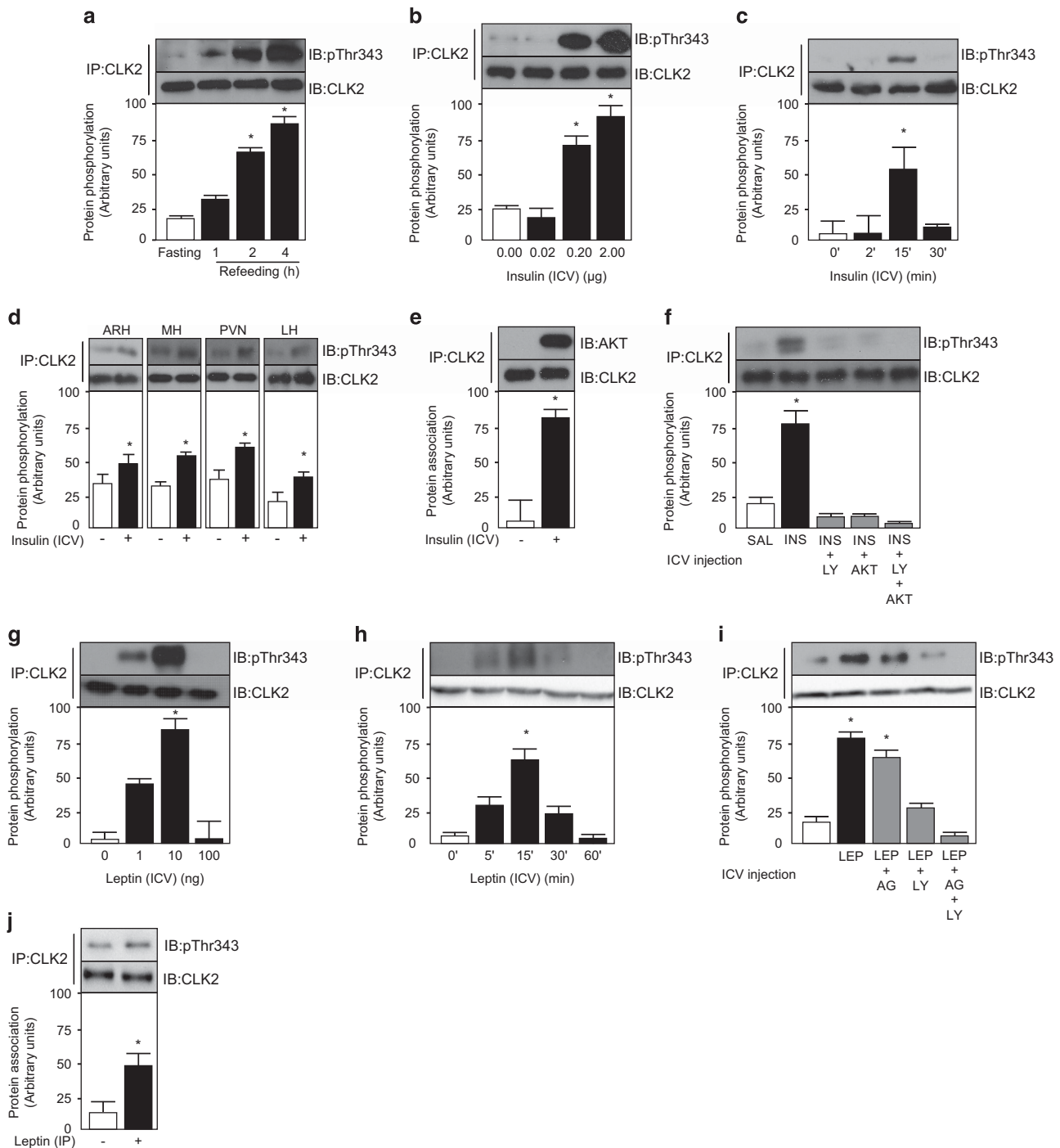


Figure 2. Hypothalamic CLK2 is regulated by nutritional status and by anorexigenic hormones in a PI3K-dependent manner. **(a)** Animals were fasted for 24 h and allowed to refeed for up to 4 h. CLK2^{Thr343} phosphorylation was measured in these conditions. **(b)** Dose-dependent CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin in the hypothalamus. **(c)** Time course of CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin in the hypothalamus. **(d)** CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin in hypothalamic nuclei: ARH (arcuate nucleus), MBH (ventromedial and dorsomedial of hypothalamus), LH (lateral hypothalamus) and PVN (paraventricular nucleus). **(e)** Hypothalamic CLK2 and AKT association in response to insulin. **(f)** CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin with or without LY249003 (2.0 μ g/40 μ M) and/or AKTVIII (2.0 μ g/40 μ M) inhibitors. **(g)** Dose-dependent CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to leptin in the hypothalamus. **(h)** Time course of CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to leptin in the hypothalamus. **(i)** CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to leptin with or without AG490 (2 μ l/50 μ M) and/or LY249003 (2.0 μ g/40 μ M) inhibitors. **(j)** CLK2^{Thr343} phosphorylation in hypothalamus after intraperitoneal leptin (3 mg kg⁻¹ BW) injection. Data are presented as means $\pm$ s.e.m. from 5 mice per group. One-way ANOVA with Bonferroni post-test was used to analyze all data, except for **d** and **e** for which we used two-tailed Student's t-test. * $P \leq 0.05$ versus other groups. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting. LY249003 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) AKTVIII (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and JAK2 inhibitor (AG490, Tocris Bioscience, Bristol, UK) were injected ICV 1 h before insulin (2 μ g) or leptin (10 ng), respectively, in control mice. After 15 min, hypothalami were dissected for protein collection.

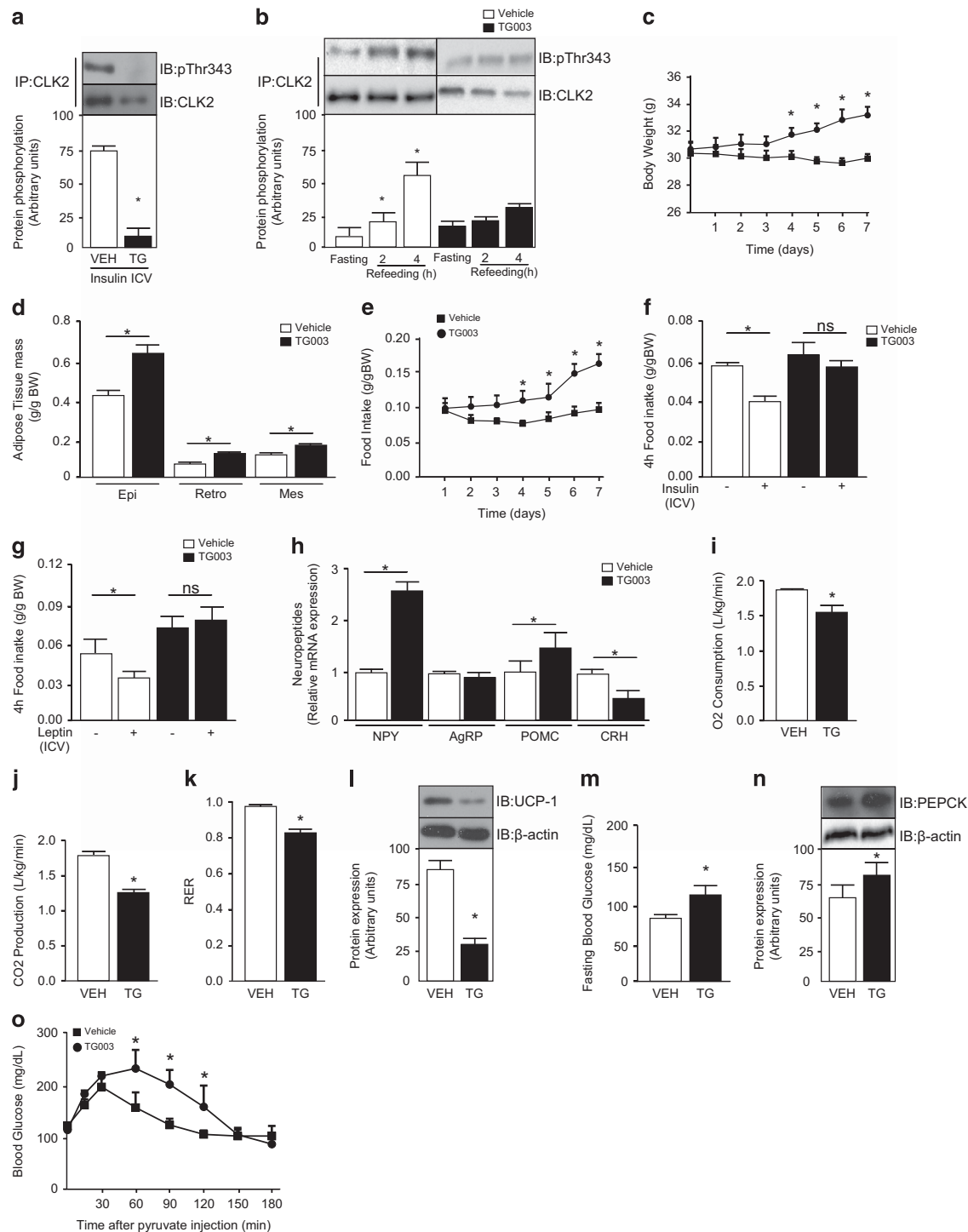


Figure 3. Chronic pharmacological inhibition of CLK2 expression in the hypothalamus alters food intake, energy expenditure and glucose metabolism. In these experiments, we used a pharmacological inhibitor: TG003 (Merck, Darmstadt, Germany) (2 μ l per 60 μ m) injected ICV twice daily (0800 hours and 1700 hours) for 7 days to inhibit CLK2 expression. Vehicle (VEH) (dimethyl sulfoxide, 0.3%) injections were used as control. **(a)** CLK2 expression and threonine 343 phosphorylation after ICV inhibition with TG003 for 7 days. **(b)** CLK2^{Thr343} phosphorylation after fasting and refeeding conditions in mice on chow treated with ICV TG003. **(c)** Body weight during TG003 treatment. **(d)** Epididymal, retroperitoneal and mesenteric fat mass after 7 days of TG003 treatment. **(e)** Food intake during TG003 treatment. **(f, g)** Four hour food intake in response to insulin or leptin after 7 days of TG003 treatment, saline ICV injection was used as control. **(h)** Twenty-four hour fasting NPY, AgRP, POMC and CRH mRNA levels in the hypothalamus of mice treated with TG003 or vehicle. **(i)** O₂ consumption, **(j)** CO₂ production and **(k)** RER measurements after 7 days of TG003 treatment. **(l)** UCP-1 protein expression in the BAT after TG003 treatment for 7 days. **(m)** Fasting blood glucose, **(n)** PEPCK protein expression in the liver and **(o)** pyruvate tolerance test after 7 days of TG003 treatment. Data are presented as means $\pm$ s.e.m. from 7 to 10 mice per group. Two-tailed Student's *t*-test or one-way ANOVA with Bonferroni post-test were used to analyze the data. **P* $\leq$ 0.05 versus vehicle. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting. Primers: CLK2, Mm00432578_m1; NPY, Mm00445771_m1; POMC, Mm00435874_m1; AgRP, Mm00475829_g1 and CRH, Mm01293920_s1 for mouse (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

hypothalamus of control mice (Figure 3a). We observed that TG003 treatment blunted CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of refeeding mice (Figure 3b). The treatment with TG increased BW and FI starting on day 4 up to 7 days (Figures 3b and d), accompanied by enhanced adiposity (Figure 3c). Treatment with TG003 inhibited the anorexigenic effect of insulin as demonstrated by the lack of response to insulin in mice previously treated with TG003. As expected, insulin was able to reduce FI in vehicle-treated mice (Figure 3e). Similarly, acute leptin injection decreased FI in mice treated previously with vehicle and had no effect on FI in TG003-treated mice (Figure 3f). Treatment with TG003 increased fasting NPY and POMC and decreased corticotropin-releasing hormone (CRH) neuropeptide gene expression compared to vehicle-treated mice (Figure 3g). TG003-treated mice showed lower O₂ consumption, CO₂ production and RER compared with vehicle-treated mice (Figures 3h–j). Consistently with this data, UCP-1 protein expression was faint in the BAT of chronic TG003-treated mice (Figure 3k). In another experiment, we observed that TG003 treatment increased fasting blood glucose (Figure 3l), which was consistent with PEPCK protein levels in the liver in this group (Figure 3m). In addition, we observed enhanced blood glucose in response to pyruvate in TG003-treated mice (Figure 3n).

Chronic knockdown of CLK2 expression in the hypothalamus alters food intake, energy expenditure and glucose metabolism

To confirm that there were no side effects of infusing small interfering RNA (siRNA) continuously via ICV cannula for 7 days, we added a sham group (without infusion) and another group receiving saline for 7 days by minipump. Only mice treated with siRNA-CLK2 showed an efficient decrease, up to 70%, of CLK2 gene expression in the hypothalamus (Figure 4a). Chronically knockdown of CLK2 in the hypothalamus enhanced BW, adiposity and FI compared with siSCR-treated mice (Figures 4b–d). Acute insulin ICV injection diminished FI in mice treated previously with siSCR and had no effect on FI in siCLK2-treated mice. Similarly, there was a decrease on FI in response to leptin in siSCR-treated mice. In the siCLK2-treated mice, leptin injection had no effect on FI (Figures 4e and f). After knockdown of CLK2 in the hypothalamus, there was an increase in NPY neuropeptide gene expression without changes in AgRP, POMC and CRH neuropeptides gene expression (Figure 4g). We also observed decreased O₂ consumption, CO₂ production and RER in siCLK2-treated mice (Figures 4h–j). Consistently, with reduced UCP-1 protein expression in BAT in this group (Figure 4k). In addition, the treatment with siCLK2 increased fasting insulin and leptin serum levels and did not alter adiponectin serum levels (Figure 4l). Fasting blood glucose levels was enhanced after siCLK2 treatment and accordingly PEPCK protein expression was increased in siCLK2 group (Figures 4m and n). Our data also showed that the phosphorylation of FoxO1 was increased after insulin ICV injection in siSCR-treated mice, although in siCLK2-treated group there was a suppression of FoxO1 phosphorylation in response to insulin (Figure 4o).

CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin and leptin is impaired in the hypothalamus of obese mice

As expected, acute ICV injection of insulin increased AKT and CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of mice on chow. However, this effect was blunted in the hypothalamus of mice on HFD (Figures 5a and b). Likewise, acute leptin ICV injection increased JAK2 and CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of mice on chow and this effect was faint in mice on HFD (Figures 5c and d). In addition, 1 h of refeeding after prolonged fasting increased CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of db/+ mice and this effect was faint in the hypothalamus of db/db mice (Figure 5e).

Overexpression of CLK2 in the mediobasal hypothalami of obese mice partially reverses the obese phenotype

GFP staining showed successful injections in the MBH (Figure 6a). In a separated group of mice, we performed the injections and measured the relative CLK2 expression in the hypothalamus, mice that received ad-CLK2 showed enhanced CLK2 mRNA expression in comparison of ad-GFP injected mice (Figure 6b). After 4 days of ad-CLK2 injection in the MBH of high-fat-fed mice, we observed a decrease on BW and reduction on FI (Figures 6c and d). O₂ consumption, CO₂ production and RER were enhanced in mice on HFD expressing ad-CLK2 (Figures 6e–g). Fasting blood glucose was reduced from 209 ± 16 mg dl⁻¹ in mice on HFD expressing ad-GFP to 170 ± 13 mg dl⁻¹ in mice on HFD expressing ad-CLK2 in the MBH (Figure 6h). Our data demonstrated that after 5 days of ad-CLK2 injection, there was a marked reduction on BW and decrease on FI in db/db mice (Figures 6i and j), consistently, increased O₂ consumption, CO₂ production and RER (Figures 6k–m). Interestingly, overexpressing CLK2 in the MBH of db/db mice decreased markedly fasting blood glucose from 320 ± 29 mg dl⁻¹ (ad-GFP) to 104 ± 16 mg dl⁻¹ (ad-CLK2; Figure 6n).

DISCUSSION

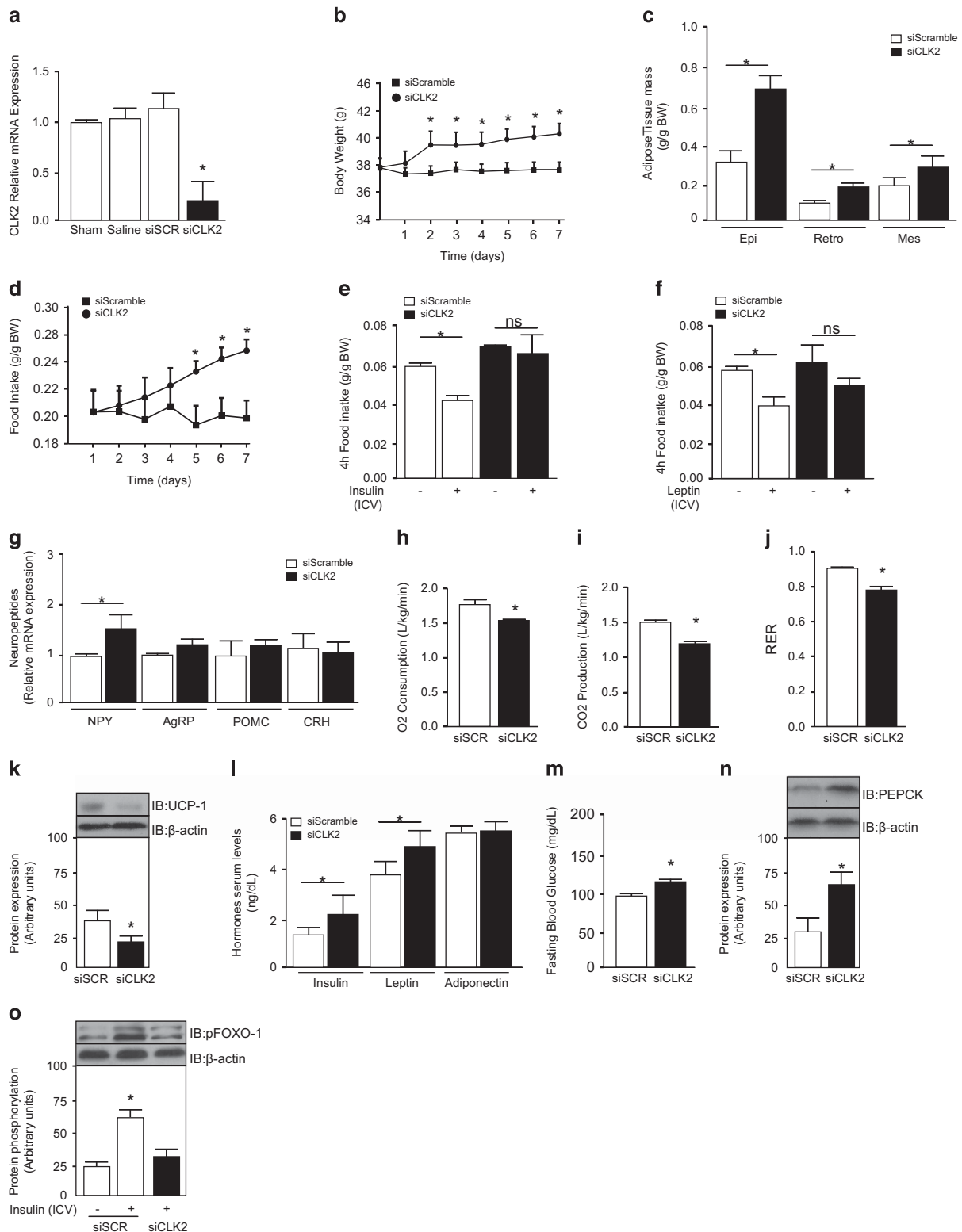
The present study showed that CLK2 is robustly expressed in hypothalamic neurons, having a crucial role in the regulation of energy balance. Hypothalamic CLK2^{Thr343} phosphorylation, which induces CLK2 activity¹⁶ is regulated *in vivo* by refeeding and by insulin and leptin, mostly via PI3K. The reduction of CLK2 expression in the hypothalamus, by chronic inhibition, was sufficient to increased BW, fat mass, FI and to decreased energy expenditure in mice on chow. In contrast, CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus in response to insulin, leptin or refeeding was impaired in obese mice. Overexpressing CLK2 in the MBH of mice on HFD or in db/db mice partially reversed the obese phenotype. Lastly, chronic CLK2 inhibition in the hypothalamus was associated with a slight increase in the fasting blood glucose levels, reduction in PEPCK expression in the liver and enhanced glucose production from pyruvate.

Although CLK kinases show elevated evolutionary conservation, there is a scarcity of information regarding their targets, regulation and function *in vivo*. Recent data showed that neuronal CLK2 might be implicated in autistic features.²⁶ However, the role of CLK2 in metabolism was only described in liver regulating hepatic gluconeogenesis and fatty acid oxidation.^{16,17} In the present study we are expanding the knowledge regarding CLK2, describing its crucial role in hypothalamic neurons affecting energy balance. Insulin induces hypothalamic CLK2^{Thr343} phosphorylation in a PI3K-dependent manner. A co-immunoprecipitation suggested that upon insulin stimulation, there was an association between both CLK2 and AKT in the hypothalamus, similar what occurs in the liver. The activation of PI3K/AKT pathway in the hypothalamus induces phosphorylation and exclusion of FoxO1 from the cellular nucleus.²⁷ This effect decreases food intake because FoxO1 in the nucleus is a transcriptional activator of the AgRP/NPY genes and represses the transcription of the POMC gene.⁸ By analogy, in the liver, the activation of PI3K leads to AKT activation and phosphorylation of CLK2, which in turn phosphorylates SR domain on PGC-1α inhibiting its interaction with FoxO1 and finally decreasing hepatic gluconeogenic genes expression.¹⁶ Here, *in vivo* knockdown of CLK2 in the hypothalamus decreased FoxO1 phosphorylation in response to insulin suggesting that FoxO1 was still in the nucleus regulating neuropeptides transcription. Interestingly, we found increased NPY mRNA levels after chronic inhibition of CLK2 in the hypothalamus, which could be a direct or indirect effect of CLK2. This result also suggests a possible connection between CLK2 and FoxO1 in the hypothalamus. Therefore, it would not be surprising if the CLK2 effects expand

beyond FoxO1. However, these phenomena deserve more investigation.

It is not completely known why leptin at the dose of 100 ng was not able to increase CLK2^{Thr343} phosphorylation. This finding may be related to the association/activation between CLK2 and serine/

threonine protein phosphatase 2A (PP2A), because preliminary data showed that at 100 ng of leptin, there was a maximal association between CLK2 and PP2A (data not shown). However, our data supported that given leptin either ICV or i.p. may recapitulate some of the refeeding response by increasing



CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of chow mice *in vivo*. This effect occurred mostly via PI3K, suggesting that CLK2 is a leptin signaling protein in hypothalamus.

In parallel to the results of hormone infusions, we also observed that in refeeding conditions, ICV TG003 treatment was able to blunt CLK2^{Thr343} phosphorylation, suggesting a potential physiological regulation of hypothalamic CLK2.

Mice treated with siCLK2 showed enhanced leptin circulating levels and this is consistent with the data of adiposity increment presented by this group, once leptin is one adipocyte-derived hormone and its levels reflect the amount of adipose tissue. Enhanced adiposity may be, at least in part, due to hyperphagia observed in mice with reduced CLK2 expression in the hypothalamus. The lack of anorectic response to insulin and leptin in the hypothalamus of mice treated with siCLK2 or TG003 reinforces the idea that CLK2 participates in insulin and leptin signaling and action and may contribute to the observed hyperphagia in these

animals. Consistent with this, *in vivo* reduction of CLK2 expression altered neuropeptides expression, because both treatments enhanced NPY mRNA levels in the hypothalamus. TG003 treatment also increased POMC and decreased CRH mRNA levels. This discrepancy may be due to the specificity of TG003, which in parallel to induce CLK2 ubiquitination and degradation,^{16,28} also inhibit other CLK family proteins including CLK1 and CLK4.²⁸ Therefore, this wide inhibition might interfere in POMC mRNA levels, once CLK family participating in alternative splicing regulation. To clarify this issue, we conducted experiments using a siRNA to knockdown specifically CLK2 in the hypothalamus. In this new set of experiments, we showed that mice treated with siRNA of CLK2 had only increments on NPY mRNA levels and any increment on POMC mRNA levels. This result was totally consistent with metabolic findings after knocking down CLK2 in the hypothalamus.

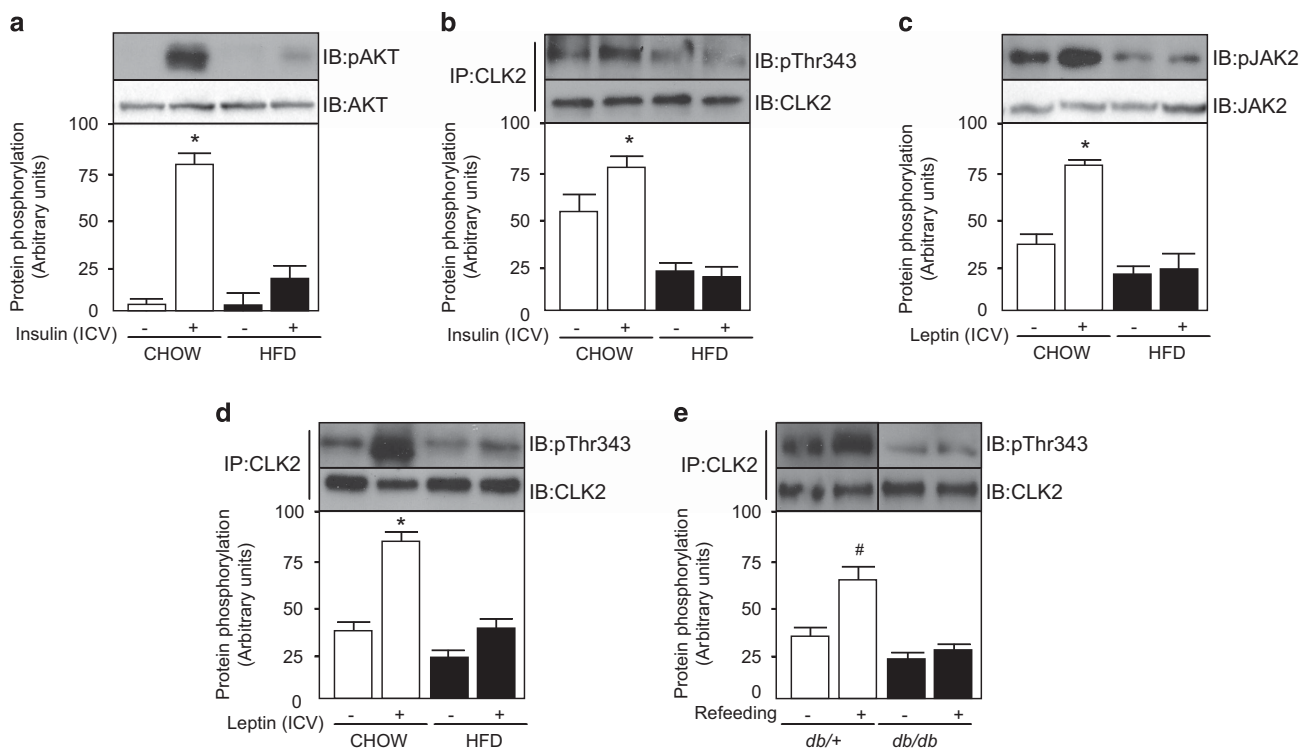


Figure 5. CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin and leptin is impaired in the hypothalamus of obese mice. (**a**, **b**) AKT^{Ser473} and CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to insulin in the hypothalamus of mice on chow or HFD. Saline was used as control. (**c**, **d**) JAK2^{Tyr1007/1008} and CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to leptin in the hypothalamus of mice on chow or HFD. Saline was used as control. (**e**) CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of db/+ or db/db mice after 1 h of refeeding after prolonged fasting (24 h). Data are presented as means $\pm$ s.e.m. from 4 mice per group. One-way ANOVA with Bonferroni post-test was used. * $P \leq 0.05$ versus other groups on HFD or chow. # $P \leq 0.05$ versus other groups db/+ or db/db. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting.

Figure 4. Chronic knockdown of CLK2 expression in the hypothalamus alters food intake, energy expenditure and glucose metabolism. In these experiments, we used a siRNA against CLK2 (sequence: 5'phos/GUAUUCUAUAGGACUGC 3') or a siSCR (sequence: 5'phos/UCGGCAGUCCUAUG 3') as a control. Both, siCLK2 and siSCR were infused continuously for 7 days by an ICV micro-osmotic pump Alzet 1007D (DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA). (**a**) CLK2 mRNA levels in the hypothalamus of mice on chow submitted to sham (with no infusion) or treated with saline; with siSCR or with siRNA-CLK2 for 7 days. (**b**) Body weight during siRNA treatment. (**c**) Epididymal, retroperitoneal and mesenteric relative fat mass after siRNA treatment. (**d**) Food intake during siRNA treatment. (**e**, **f**) Four hour food intake in response to insulin or leptin after 7 days of siRNA treatment, saline ICV injection was used as control. (**g**) Twenty-four hour fasting NPY, AgRP, POMC and CRH mRNA levels in the hypothalamus of mice treated with siRNA. (**h**) O₂ consumption, (**i**) CO₂ production and (**j**) RER measurements after 7 days of siRNA treatment. (**k**) UCP-1 protein expression in the BAT after siRNA treatment for 7 days. (**l**) Serum insulin, leptin and adiponectin levels measured after overnight fasting in mice treated with siRNA for 7 days. (**m**) Fasting blood glucose and (**n**) PEPCK protein expression in the liver measured after 7 days of siRNA treatment. (**o**) FoxO1 phosphorylation in response to insulin after siRNA treatment. Data are presented as means $\pm$ s.e.m. from 5 to 6 mice per group. Two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA with Bonferroni post-test were used to analyze the data. * $P \leq 0.05$ versus vehicle. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblotting.

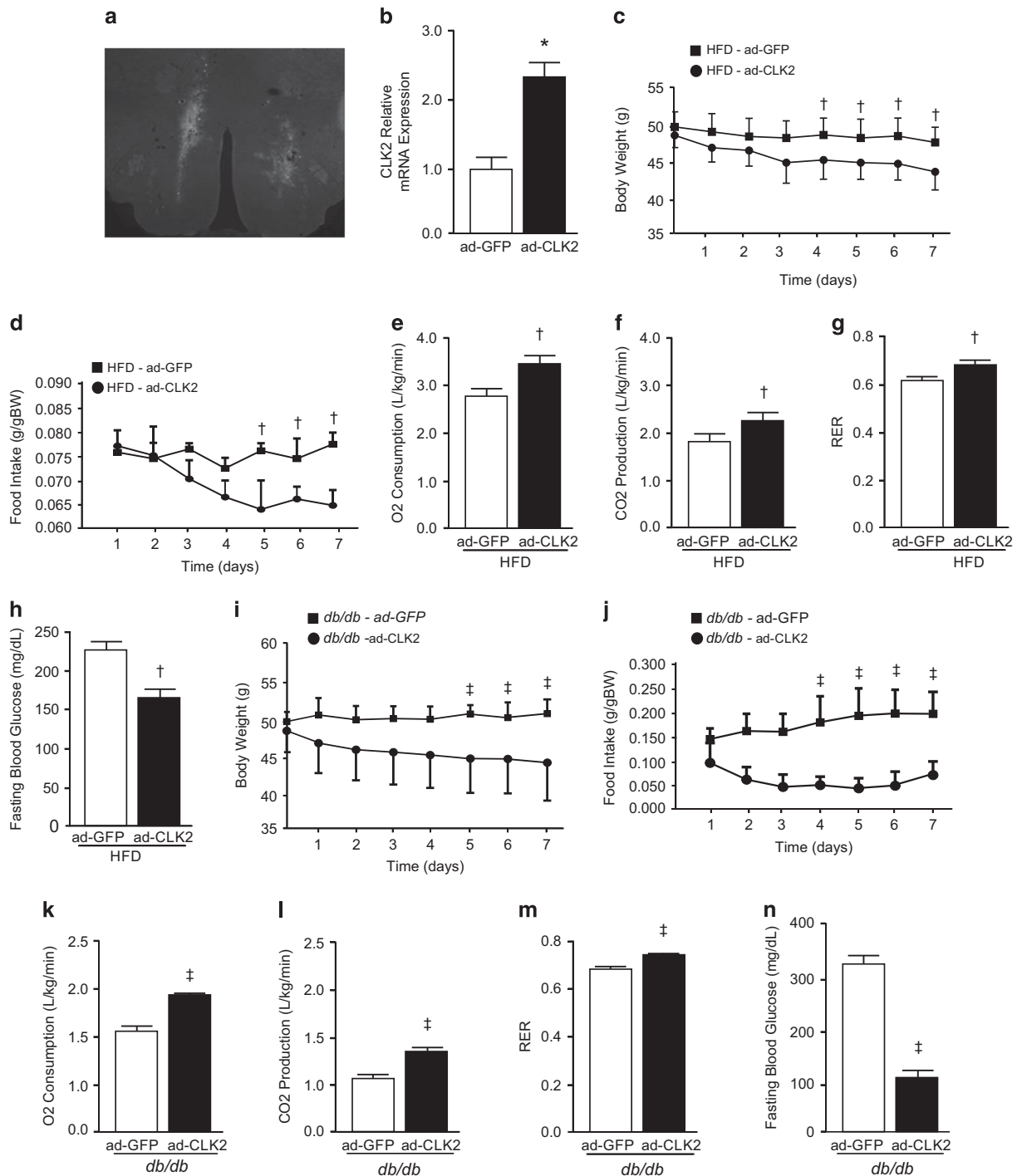


Figure 6. Overexpression of CLK2 in the mediobasal hypothalamus of obese mice partially reverses the obese phenotype. We used recombinant adenovirus expressing CLK2 with GFP (ad-CLK2) or adenovirus expressing only GFP (ad-GFP) and injected bilaterally in the mediobasal hypothalamus of HFD fed or *db/db* mice. (a) GFP staining showing the sites of the injections in the mediobasal hypothalamus. (b) CLK2 mRNA levels in the hypothalamus in both groups treated with adenovirus. (c) Body weight and (d) food intake were followed up to 7 days after injections in mice on HFD. (e) O₂ consumption, (f) CO₂ production, (g) RER and (h) fasting blood glucose measurements 7 days after injections in mice on HFD. (i) Body weight and (j) food intake were followed up to 7 days after injections in *db/db* mice. (k) O₂ consumption, (l) CO₂ production, (m) RER and (n) fasting blood glucose measurements 7 days after injections in *db/db* mice. Data are presented as means $\pm$ s.e.m. from 3 to 5 mice per group. Two-tailed Student's *t*-test or one-way ANOVA with Bonferroni post-test was used to analyze data. $^{\dagger}P \leq 0.05$ versus HFD-ad-GFP. $^*P \leq 0.05$ versus *db/db*-ad-GFP.

A reduction in energy expenditure observed after siCLK2 or TG003 treatment may also contribute to enhance adiposity in these mice. These mice had decreased O₂ consumption and UCP-1 levels in BAT, suggesting reduced thermogenesis. This result may be due to an

impairment of insulin and leptin action in the hypothalamus observed after chronic reduction of CLK2. The impact of a reduction of CLK2 on energy expenditure is probably tissue specific, because liver-specific CLK2 knockout mice did not exhibit changes in energy expenditure.¹⁷

Although the role of CLK2 in energy expenditure seems to be tissue specific, its role in RER seems to be similar after knockdown in liver or hypothalamus. The deletion of CLK2 in the liver induced lower RER, suggesting a preference for fatty acids oxidation. This was associated with enhanced hepatic machinery of fatty acid oxidation and ketogenesis.¹⁷ In the present study, the reduction of CLK2 in the hypothalamus also decreased RER, suggesting that hypothalamic CLK2 has a critical role to determine the fuel substrate that should be used as an energy source for the whole body. It is important to mention that in this situation, although the animal is oxidizing more lipids, the marked reduction in O₂ consumption and the lack of anorexigenic response to insulin and leptin results in increased body weight.

HFD induces insulin and leptin resistance in the different brain regions of rodents thereby impairing energy balance.^{9,24,29} In this context, CLK2^{Thr343} phosphorylation was reduced in response to insulin or leptin in the hypothalamus of mice fed with HFD. In addition to HFD, *db/db* mice, which develop marked obesity, diabetes and hyperphagia³⁰ also demonstrated a reduction on CLK2^{Thr343} phosphorylation in response to refeeding. Regardless of marked reduction in CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus of obese mice, overexpression of CLK2 in the MBH by adenovirus was able to reverse hyperphagia and the lower energy expenditure, accompanied by a marked decrease in adiposity, reinforcing that hypothalamic CLK2 has an important role in the maintenance of energy homeostasis.

Administration of insulin to the hypothalamus attenuates hepatic glucose production lowering blood glucose levels in a PI3K-dependent manner. This effect involves ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels in hypothalamic neurons, which communicate with the liver by vagus nerve.^{31,32} Damages of hypothalamic insulin signaling impair the effect of insulin suppressing hepatic glucose production.^{33,34} Recent evidences showed that central insulin is able to induce hepatic Ii-6 production, consequently increasing pSTAT3 and pFoxO1, leading to the suppression of gluconeogenesis genes expression in liver. Leptin is also able to control glucose metabolism in liver by increase in STAT3 and PI3K pathways in the hypothalamus.³⁵ Herein, we observed that hypothalamic CLK2 was regulated by insulin in a PI3K-dependent manner and overexpression of CLK2 in the hypothalamus of *db/db* mice normalized fasting blood glucose levels. Interesting, a chronic CLK2 inhibition in the hypothalamus was associated with a slight increase in the fasting blood glucose levels. It was consistent with a reduction in the protein expression of PEPCK in the liver, which is a key enzyme in the gluconeogenesis process. In addition, TG003 treatment was associated with enhanced glucose production from pyruvate. Those effects likely were independent of changes in food intake or body weight because they persisted in pair-fed mice (data not shown). Together, these data suggest that CLK2 may be participating in hypothalamic signaling contributing to control hepatic glucose production.

In summary, our data provide evidence that CLK2 is expressed in hypothalamic neurons and integrates insulin and leptin signaling and action. Hypothalamic CLK2 is required to maintain body weight, fat mass, food intake and energy expenditure, contributing to the energy homeostasis in mice. In obese models, CLK2^{Thr343} phosphorylation in the hypothalamus is impaired, which may contribute to the hyperphagia and lower energy expenditure observed in these mice. Overexpressing CLK2 in the MBH of HFD mice or *db/db* mice reversed, partially, the obese phenotype. In addition, CLK2 may integrate hypothalamic signaling that participates in the control of hepatic glucose production. The potential of CLK2 in hypothalamus as a molecule for new therapeutic approaches to obesity and diabetes is promising.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for financial support from State University of Campinas (FUNCAP), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo): Auxílio Regular 2012/10338-6 and 2015/00343-0 and CEPID 2013/07607-8, São Paulo, Brazil and from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Universal (481084/2013-4) and INCT (Instituto Nacional Ciência e Tecnologia de Obesidade e Diabetes; 573856/2008-7). The authors acknowledge the technical assistance of Luis Janeri, Jósimo Pinheiro, Dioze Guadagnini, Lígia Parreira Muniz and Ramon Henrick Zorzeto dos Santos from the Department of Internal Medicine, State University of Campinas. We thank Professor Armando Moraes Ventura for kindly provide pShires vector. The present work received financial support from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo): Auxílio Regular 2012/10338-6 and CEPID 2013/07607-8, São Paulo, Brazil and from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Universal (481084/2013-4) and INCT (Instituto Nacional Ciência e Tecnologia de Obesidade e Diabetes) (573856/2008-7).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PGFQ designed, planned and performed all the experiments, analyzed data and wrote the manuscript; TMZ, ACS and LW performed experiments; JDJ and ICF performed and analyzed the immunohistochemistry assays; AHBM and ILC contributed with siRNA assays designing; FMS and PGFQ performed the adenovirus production and purification and reviewed the manuscript; POP directed the study, provided financial support and reviewed data analysis and the manuscript.

REFERENCES

- 1 Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1212**: 97–113.
- 2 Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG *et al*. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 2003; **52**: 227–231.
- 3 Pardini AW, Nguyen HT, Figlewicz DP, Baskin DG, Williams DL, Kim F *et al*. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res* 2006; **1112**: 169–178.
- 4 Morton GJ, Schwartz MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**: 56–62.
- 5 Fukuda M, Jones JE, Olson D, Hill J, Lee CE, Gautron L *et al*. Monitoring FoxO1 localization in chemically identified neurons. *J Neurosci* 2008; **28**: 13640–13648.
- 6 Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ *et al*. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 2002; **22**: 9048–9052.
- 7 Belgardt BF, Husch A, Rother E, Ernst MB, Wunderlich FT, Hampel B *et al*. PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab* 2008; **7**: 291–301.
- 8 Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1212**: 97–113.
- 9 Flak JN, Myers MG. Minireview: CNS mechanisms of leptin action. *Mol Endocrinol* 2016; **30**: 3–12.
- 10 Carvalheira JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araújo EP, Velloso LA *et al*. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 2005; **13**: 48–57.
- 11 Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; **404**: 661–671.
- 12 Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 2000; **51**: 255–277.
- 13 Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 2000; **16**: 894–902.
- 14 Wong R, Balachandran A, Mao AY, Dobson W, Gray-Owen S, Cochrane A. Differential effect of CLK SR Kinases on HIV-1 gene expression: potential novel targets for therapy. *Retrovirology* 2011; **8**: 47.
- 15 Yoshida T, Kim JH, Carver K, Su Y, Weremowicz S, Mulvey L *et al*. CLK2 is an oncogenic kinase and splicing regulator in breast cancer. *Cancer Res* 2015; **75**: 1516–1526.
- 16 Rodgers JT, Haas W, Gygi SP, Puigserver P. Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis. *Cell Metab* 2010; **11**: 23–34.

- 17 Tabata M, Rodgers JT, Hall JA, Lee Y, Jedrychowski MP, Gygi SP *et al*. Cdc2-like kinase 2 suppresses hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis through disruption of the PGC-1 α and MED1 complex. *Diabetes* 2014; **63**: 1519–1532.
- 18 Nam SY, Seo HH, Park HS, An S, Kim JY, Yang KH *et al*. Phosphorylation of CLK2 at serine 34 and threonine 127 by AKT controls cell survival after ionizing radiation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 31157–31163.
- 19 Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J *et al*. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia* 2007; **50**: 1949–1959.
- 20 Prada PO, Ropelle ER, Mourão RH, de Souza CT, Pauli JR, Cintra DE *et al*. EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 2009; **58**: 2910–2919.
- 21 Prada PO, Quaresma PG, Caricilli AM, Santos AC, Guadagnini D, Morari J *et al*. Tub has a key role in insulin and leptin signaling and action *in vivo* in hypothalamic nuclei. *Diabetes* 2013; **62**: 137–148.
- 22 Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B *et al*. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; **428**: 569–574.
- 23 Quaresma PG, Reencober N, Zanutto TM, Santos AC, Weissmann L, de Matos AH *et al*. Pioglitazone treatment increases food intake and decreases energy expenditure partially via hypothalamic adiponectin/adipoR1/AMPK pathway. *Int J Obes* 2016; **40**: 138–146.
- 24 Weissmann L, Quaresma PG, Santos AC, de Matos AH, Pascoal VD, Zanutto TM *et al*. IKK ϵ is key to induction of insulin resistance in the hypothalamus, and its inhibition reverses obesity. *Diabetes* 2014; **63**: 3334–3345.
- 25 Muotri AR, Marchetto MC, Zerbini LF, Libermann TA, Ventura AM, Sarasin A *et al*. Complementation of the DNA repair deficiency in human xeroderma pigmentosum group a and C cells by recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 1833–1844.
- 26 Bidinosti M, Botta P, Kruttner S, Proenca CC, Stoeher N, Bernhard M *et al*. CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. *Science* 2016; **351**: 1199–1203.
- 27 Vogt MC, Brüning JC. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol Metab* 2013; **24**: 76–84.
- 28 Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, Onogi H, Koizumi J, Koizumi T *et al*. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem* 2004; **279**: 24246–24254.
- 29 Gautron L, Elmquist JK. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest* 2011; **121**: 2087–2093.
- 30 Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ *et al*. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; **84**: 491–495.
- 31 Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 2002; **8**: 1376–1382.
- 32 Könnner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X *et al*. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 2007; **5**: 438–449.
- 33 Roh E, Song do K, Kim MS. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med* 2016; **48**: e216.
- 34 Rojas JM, Schwartz MW. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes Obes Metab* 2014; **16**: 33–40.
- 35 Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M *et al*. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* 2006; **3**: 267–275.

CAPÍTULO 2

RESULTADOS ADICIONAIS OBTIDOS APÓS PUBLICAÇÃO

Em uma etapa posterior deste estudo, com o objetivo de obter a deleção de CLK2 de forma mais específica, nós utilizamos o sistema de recombinação mediado por *cre-loxP*, ou sistema *cre-loxP*. Este sistema é uma potente ferramenta de edição de genes que se tornou um pilar na pesquisa científica em diversas áreas. O sistema consiste na ação da recombinase isolada do bacteriófago P1 que recombina fragmentos de DNA (*cre*) e seus ligantes são os *loxP* (locus of crossing over (x)). São necessários dois elementos para esta tecnologia funcionar; o primeiro é uma linhagem animal geneticamente modificada para flanqueamento do gene de interesse neste caso o *Clk2*, com a sequência *loxP*. No nosso caso, o segundo elemento consistiu em um adenovírus associado capaz de expressar a recombinase *cre*, que causou a deleção do gene flanqueado (*Clk2*) nas células expressando *cre* na área da injeção que foi o hipotálamo mediobasal (MBH) (McLellan, 2017).

Para a geração dos animais com deleção de *Clk2* em MBH, foram utilizados camundongos adultos (8 semanas de idade) da linhagem *Clk2flox/flox* que foram submetidos a injeção de AAV-Cre-GFP no MBH que será referido no decorrer do texto como *Clk2flox/flox-Cre*. O grupo controle utilizado foi constituído por animais *Clk2flox/flox* submetidos a injeção no MBH de adenovírus associado que codificava somente a proteína fluorescente GFP, sem o *cre* que será referido no texto como *Clk2flox/flox-GFP*.

Como resultado, observou-se que os animais *Clk2flox/flox-Cre* apresentaram aumento significativo de peso corporal em comparação ao seu controle *Clk2flox/flox-GFP*, principalmente após a sexta semana da deleção de CLK2 (Fig. 3A). Em relação a composição corporal medida pelo método de MRI (ressonância magnética por imagem), a massa magra foi similar entre os grupos. Entretanto, o grupo *Clk2flox/flox-Cre* apresentou maior acúmulo de massa adiposa que o grupo *Clk2flox/flox-GFP* (Fig. 3B). Após o sacrifício dos animais, a massa adiposa das regiões

epididimal, mesentérica e subcutânea foi determinada, não sendo encontrada diferença significativa na massa de tecido adiposo das regiões mesentérica e subcutânea entre os grupos. No entanto, foi detectado aumento significativo da massa de tecido adiposo da região epididimal no grupo Clk2flox/flox-Cre em comparação ao grupo Clk2flox/flox-GFP (Fig. 3C).

De forma consistente com o aumento da adiposidade do grupo Clk2flox/flox-Cre, a ingestão alimentar de 24 horas desses animais foi significativamente maior comparada aos animais controles (Fig. 4A). Adicionalmente, foi investigada a sensibilidade à leptina dos grupos, por meio de injeção intraperitoneal de leptina (3mg/Kg de peso corporal) (Calbiochem) ou salina em animais submetidos a jejum *overnight*, com medida subsequente de ingestão alimentar por 2, 4 8 e 24 h. Nesse experimento, verificou-se que os animais Clk2flox/flox-GFP reduziram significativamente a ingestão alimentar após injeção de leptina comparados aos animais Clk2flox/flox-GFP que receberam injeção de salina nos tempos 2, 4 e 8 h. Por outro lado, os animais Clk2flox/flox-Cre não reduziram a ingestão alimentar após a injeção de leptina quando comparados aos animais Clk2flox/flox-Cre que receberam injeção de salina em todos os tempos estudados. Além disso, no tempo 24 h, o grupo salina Clk2flox/flox-Cre apresentou uma maior ingestão alimentar comparado ao grupo salina Clk2flox/flox-GFP. A ação da leptina no hipotálamo ocorre através de sua cascata de sinalização intracelular LEPR, JAK2 e STAT3, sendo assim, investigamos a ativação da proteína STAT3 após administração intraperitoneal de leptina. Observamos menor fosforilação de STAT3 no hipotálamo dos animais Clk2flox/flox-Cre em resposta à injeção intraperitoneal de leptina quando comparada aos seus controles Clk2flox/flox-GFP (Fig. 3D). Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito anorexigênico da leptina depende, pelo menos em parte, da expressão de CLK2 no MBH (Fig 4B-E).

Figura 3

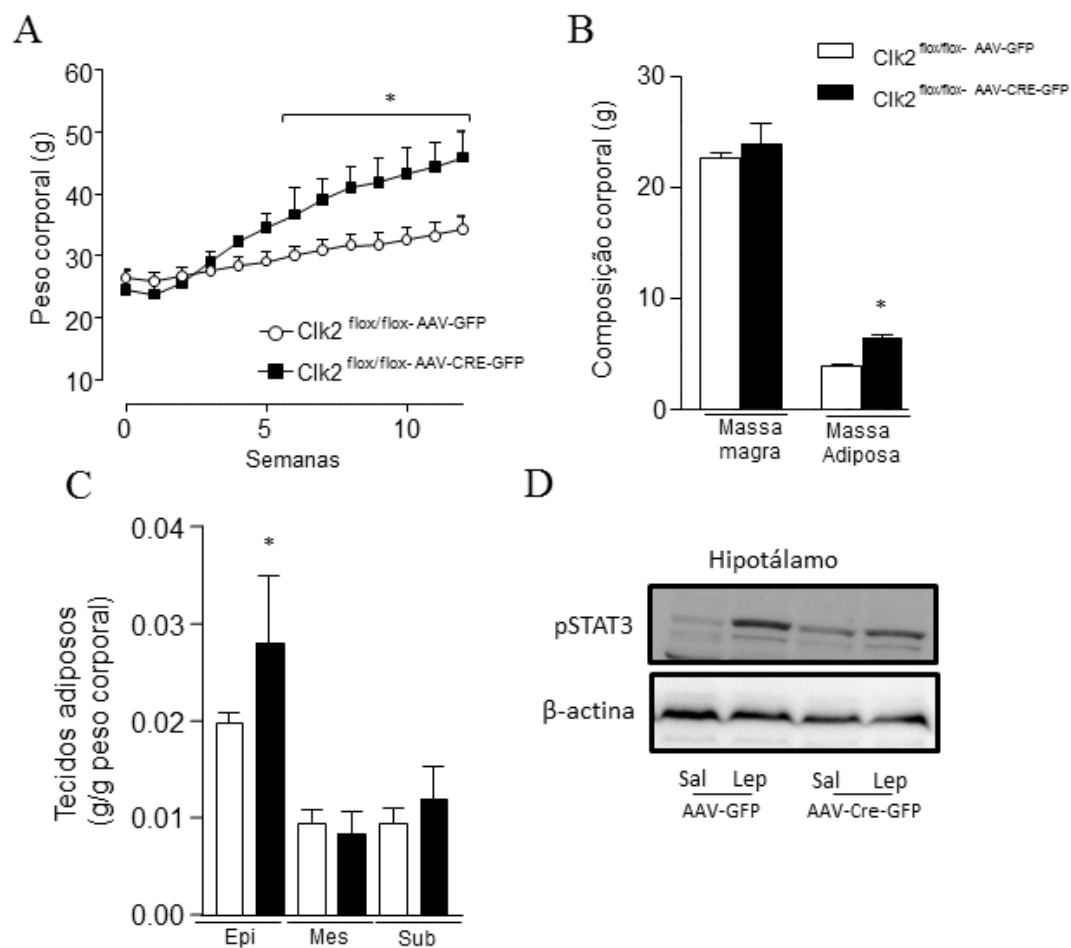


Figura 3: Deleção de CLK2 em neurônios hipotalâmicos do MBH compromete homeostase energética. Animais $Clk2^{flox/flox}$ foram submetidos a deleção hipotalâmica de CLK2 através da injeção de AAV-Cre-GFP no MBH. Nesta figura mostramos peso corporal (A), massas magra e adiposa (B), tecidos adiposos: epididymal (Epi), Mesentérico (Mes) e subcutâneo (Sub) após 12 semanas da injeção de adenovirus. Immunoblotting de pSTAT3 foi executado em amostras de hipotálamo 30 minutos após injeção IP de leptina ou salina (D). Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média de 6-8 animais por grupo. Teste t de Student foi utilizado para se comparar as médias. * $p \leq 0,05$ versus $Clk2^{flox/flox}$ -AAV-GFP.

Figura 4

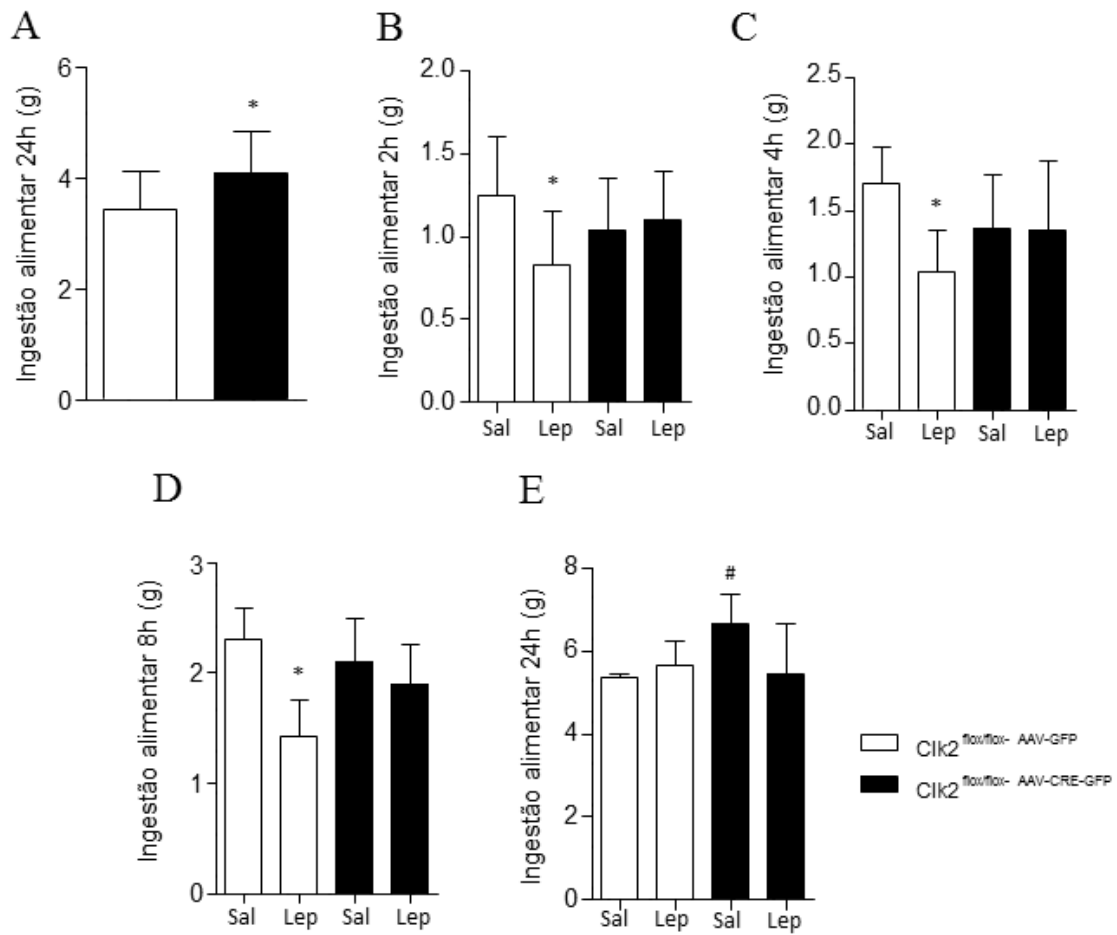


Figura 4: Deleção de CLK2 em neurônios hipotalâmicos acarreta aumento de ingestão alimentar. Ingestão alimentar de 24 horas (A), ingestão alimentar após injeção IP de leptina ou salina (B-E). Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média de 6-8 animais por grupo. Teste t de Student foi utilizado para se comparar as médias. * $p \leq 0,05$ versus *Clk2*^{flox/flox}-AAV-GFP ou *Clk2*^{flox/flox}-AAV-GFP-salina. # $p \leq 0,05$ versus outros grupos.

Diminuição da tolerância à glicose e à insulina após deleção de CLK2 hipotalâmica. A ação hipotalâmica da leptina é imprescindível no controle glicêmico em camundongos (Obici *et al.*, 2002; Pocai *et al.*, 2005). Os resultados acima sugerem uma possível deficiência na sinalização de leptina após deleção de CLK2 hipotalâmica, sendo assim, investigou-se o metabolismo de glicose nestes animais. O grupo Clk2flox/flox-Cre apresentou maior glicemia de jejum comparado ao grupo controle (Fig. 5A). Adicionalmente, o grupo Clk2flox/flox-Cre mostrou também diminuição da resposta no teste de tolerância à insulina (Fig. 5B-C) e maior intolerância à glicose (Fig. 5D-E). Os resultados acima, embora ainda iniciais, sugerem que a CLK2 no MBH pode ter um papel no circuito central que regula a homeostase da glicose. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para comprovar esses efeitos.

Figura 5

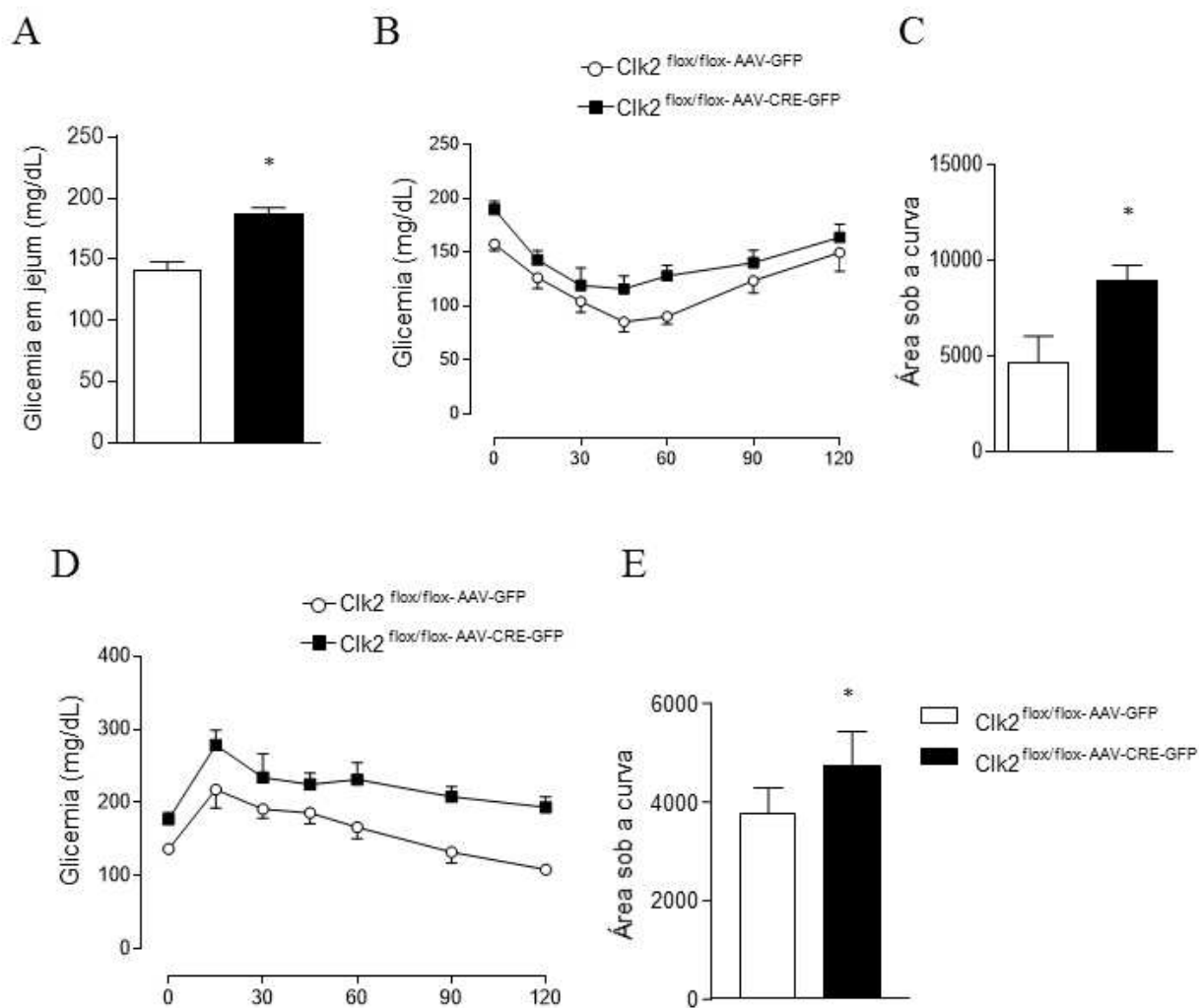


Figura 5: Diminuição da tolerância a glicose e sensibilidade a insulina após deleção de CLK2 hipotalâmica. Glicemia em jejum (A), Teste de tolerância a Glicose (GTT) (B-C) e Teste de Tolerância a Insulina (ITT)(D-E). Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média de 6-8 animais por grupo. Teste t de Student foi utilizado para se comparar as médias. * $p \leq 0,05$ versus Clk2^{flox/flox}-AAV-GFP.

Alteração da expressão gênica no tecido hepático e adiposo marrom após deleção hipotalâmica de CLK2. Geralmente, mudanças de peso corporal e adiposidade corroboram com flutuações na regulação de termogênese pelo tecido adiposo marrom (BAT), assim como, a presença de hiperglicemia em modelos animais de obesidade é muito relacionada ao desequilíbrio da gliconeogênese pelo fígado. Sendo assim, a expressão gênica de enzimas que participam do controle da gliconeogênese e da termogênese foi investigada após nos grupos Clk2flox/flox-Cre e Clk2flox/flox-GFP, utilizando-se PCR em tempo real.

No fígado de animais Clk2flox/flox-Cre, encontrou-se maior expressão gênica de algumas enzimas envolvidas na regulação de gliconeogênese como Pepck, G6Pase e glicoquinase, em comparação aos animais Clk2flox/flox-GFP (Fig. 6 A-C). Consistente com os resultados do peso corpóreo e massa adiposa, genes marcadores de atividade termogênica no BAT, como os genes ucp-1, pgc-1 α e prdm16 apresentaram menor expressão no BAT do grupo Clk2flox/flox-Cre comparado ao grupo Clk2flox/flox-GFP (Fig. 6 D-E).

Figura 6

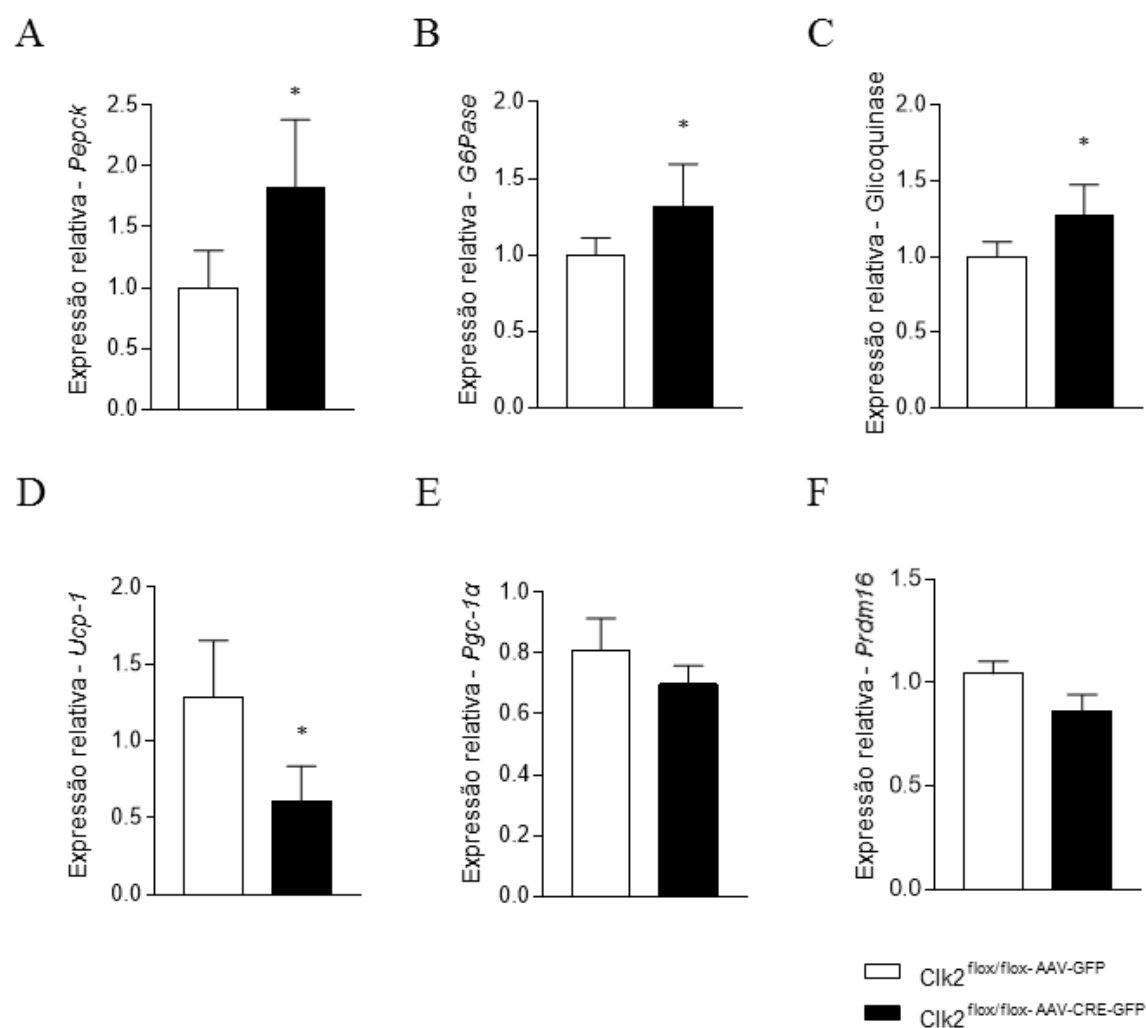


Figura 6: Aumento da expressão de marcadores de gliconeogênese e diminuição dos marcadores de termogênese em animais com deleção hipotalâmica de CLK2. Expressão relativa dos genes *Pepck*, *G6Pase* e *Glicoquinase* verificados por PCR em tempo real em amostras de fígado (A-C). Expressão relativa dos genes *Ucp-1*, *Pgc-1α* e *Prdm16* no BAT (D-F). Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média de 6-8 animais por grupo. Teste t de Student foi utilizado para se comparar as médias. * $p \leq 0,05$ versus *Clk2*^{flox/flox}-AAV-GFP.

Deleção de CLK2 no núcleo central da amígdala (CeA) não afeta metabolismo energético. De

forma complementar, procedeu-se a injeção de AAV-Cre-GFP ou como controle a injeção de AAV-GFP no CeA de animais *Clk2flox/flox*, baseado na robusta expressão de CLK2 no CeA em camundongos (Capítulo 1-Fig. 1B) e no papel que o CeA tem em resposta à insulina para o controle de ingestão e peso corpóreo (Castro et al., 2013; Areias e Prada, 2015). Os animais foram acompanhados por 16 semanas após a deleção de CLK2 no CeA e não observamos diferenças significativas de peso corporal, adiposidade ou ingestão alimentar de 24 horas entre o grupo com deleção de CLK2 no CeA quando comparados aos seus controles (Fig. 7A-D).

Figura 7

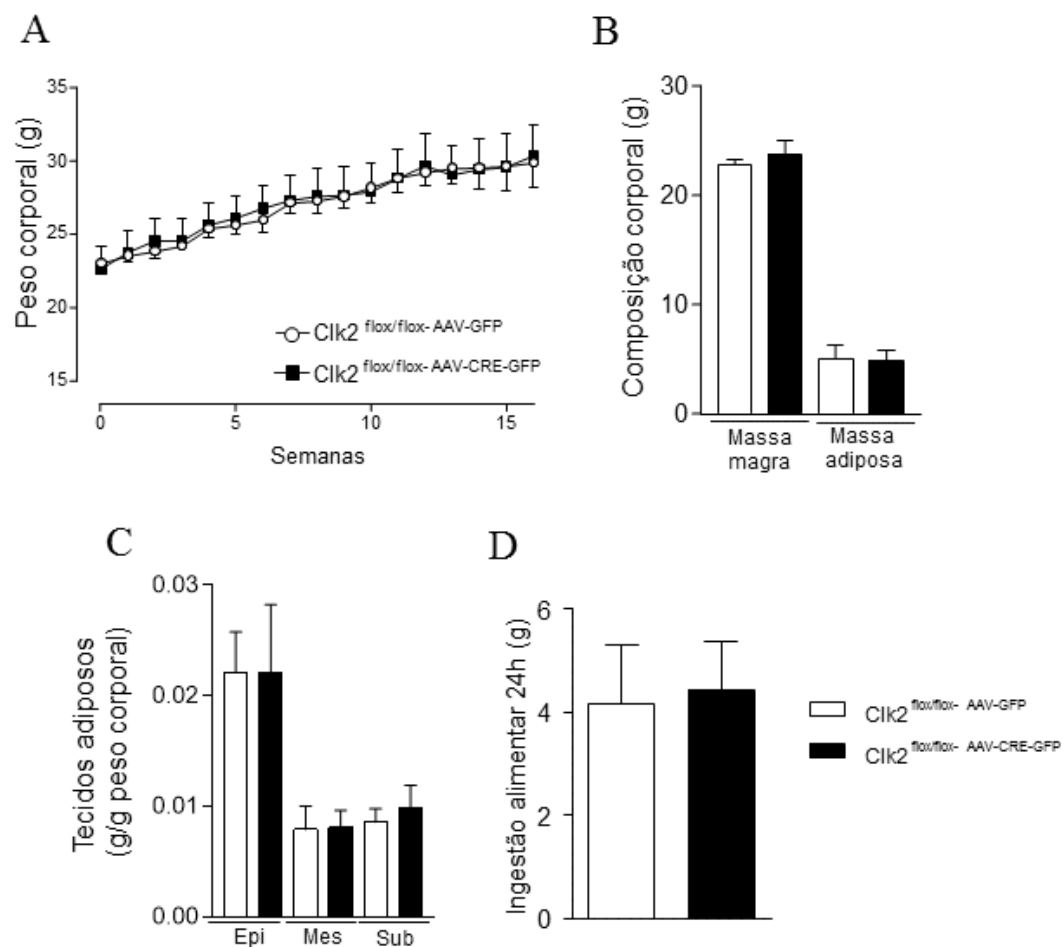


Figure 6: Deleção de CLK2 na área central da amígdala (CeA) não afeta metabolismo energético. Animais $Clk2^{flox/flox}$ foram submetidos a injeção na CeA de AAV-Cre-GFP. Foram acompanhados peso corporal (A), massa magra e adiposa (B), tecidos adiposos: epididimal (Epi), mesentérico (mes) e subcutâneo (Sub) (C) e ingestão alimentar de 24 horas na 16ª semana após injeção (D). Os dados estão apresentados como média+erro padrão da média de 5 animais por grupo. Teste t de Student foi utilizado para se comparar as médias.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no CAPÍTULO 2 corroboram com os resultados prévios apresentados no CAPÍTULO 1, que descreveram a proteína CLK2 como participante da via de insulina e leptina no hipotálamo, contribuindo na regulação do metabolismo energético. A deleção específica de CLK2 em neurônios do MBH, utilizando os animais CLK2^{flox/flox} e a injeção de AAV-CRE, induziu aumento de peso corporal, adiposidade, ingestão alimentar e diminuição de sensibilidade e de sinalização de leptina. Além disso, esses animais apresentaram redução da tolerância à insulina e glicose, reforçando a inter-relação entre CLK2 hipotalâmica e metabolismo energético.

Os dados adicionais apresentados no CAPÍTULO 2, em conjunto com dados publicados anteriormente (Rodgers *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2014; Hatting *et al.*, 2017; Quaresma *et al.*, 2017) reforçam o papel tecido-específico da CLK2, como a regulação da gliconeogênese hepática, termogênese no BAT e na regulação da homeostase energética via hipotálamo que serão abordados abaixo.

Em relação a função da CLK2 em tecido hepático, foi observado que a CLK2 é fosforilada em treonina 343 em resposta à insulina e que essa regulação induz a fosforilação da PGC-1 alfa, a qual inibe as enzimas responsáveis pela gliconeogênese e produção de glicose hepática (Rodgers *et al.*, 2010). Em *dbdb* foi encontrada uma downregulation da CLK2 no fígado e a super expressão de CLK2 por adenovírus foi capaz de suprimir a gliconeogênese desses animais, chegando quase aos níveis do animal controle (Rodgers *et al.*, 2010).

Em relação a função da CLK2 em BAT, recentemente foi demonstrado que deleção da CLK2 especificamente em BAT induziu obesidade, principalmente pela redução do gasto energético durante o jejum intermitente em animais com dieta hiperlipídica (Hatting *et al.*, 2017). A deleção da CLK2 em BAT foi associada com a redução da expressão proteica de UCP-1 nesse tecido (Hatting *et al.*, 2017),

o que seria um elemento explicativo para a redução do gasto energético desses animais. Os autores também demonstraram que a CLK2 no BAT é importante para a fosforilação da proteína CREB (cAMP response element binding), um fator de transcrição que ativa a UCP-1 durante a lipólise. Dessa forma, a deleção de CLK2 no BAT prejudicaria a sinalização CREB-UCP-1, reduzindo a lipólise (Hatting *et al.*, 2017). É conhecido que a proteína CLK2 tem sinergia com a PP2A (proteína fosfatase 2A), quando a CLK2 está inibida ocorre aumento da PP2A e vice versa (Tabata *et al.*, 2014). A inibição de PP2A em adipócitos marrons de animais com deleção de CLK2 no BAT aumentou a fosforilação do CREB e, conseqüentemente, a atividade lipolítica e de termogênese regulada por UCP-1 (Hatting *et al.*, 2017). É plausível pensar que a fosfatase PP2A possa inibir a sinalização de insulina e leptina presentes na deficiência de CLK2 hipotalâmica. Porém, mais estudos são necessários para comprovar esta possível interação.

Em relação a sua função no hipotálamo, nosso grupo demonstrou que a CLK2 estava expressa em neurônios do hipotálamo, participando das vias de sinalização da insulina e leptina nesse tecido. A inibição farmacológica da CLK2 no hipotálamo e também o *knock-down* da CLK2 induziram obesidade em animais magros, mesmo recebendo dieta padrão. Animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e *dbdb* apresentaram menor fosforilação em treonina 343 de CLK2 em hipotálamo e a super expressão de CLK2 por meio de injeção de adenovírus foi suficiente para reverter, parcialmente, esse fenótipo (Rodgers *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2014; Hatting *et al.*, 2017; Quaresma *et al.*, 2017).

Conjuntamente, os dados sobre CLK2 em diversos tecidos demonstra sua importância na fisiologia e manutenção da homeostase energética. A investigação da regulação de CLK2 hipotalâmica e seu papel no controle do metabolismo energético e de glicose apresentados aqui têm o potencial de

desdobramento em investigações futuras nos mecanismos intracelulares de diferentes tipos neuronais envolvidos no controle do balanço energético.

Os resultados obtidos após a deleção de CLK2 no CeA, sugerem que, mesmo sendo uma área com robusta expressão de CLK2 (Capítulo 1-Fig. 1B) e ligada ao controle de ingestão alimentar (Castro *et al.*, 2013; Areias e Prada, 2015), a deleção de CLK2 nesse núcleo não afetou o metabolismo energético. Os animais $Clk2^{flox/flox}$ submetidos a injeção no CeA de AAV-Cre-GFP para deleção de CLK2, demonstraram similar evolução de peso corporal, adiposidade e ingestão alimentar quando comparados com o seu grupo controle. É possível que a proteína CLK2 possua um papel diferente ao controle de metabolismo energético na amígdala, o que demandaria mais investigações nesses animais.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a proteína CLK2 é expressa e regulada em neurônios hipotalâmicos por estado nutricional, insulina e leptina. Esta regulação se mostra deficiente no hipotálamo de modelos animais de obesidade, como os alimentados com dieta hiperlipídica e com mutação do receptor de leptina (*dbdb*).

A inibição ou deleção de CLK2 hipotalâmica acarretou no desenvolvimento de hiperfagia, menor gasto energético e, conseqüentemente, do fenótipo obeso. De modo contrário, o restabelecimento da expressão de CLK2 hipotalâmica em modelos animais de obesidade restaurou, ao menos em parte, a homeostase energética.

Por fim, os dados indicam que a CLK2 integra a sinalização de insulina e leptina no hipotálamo, contribuindo para o controle da homeostase energética, sendo uma molécula com potencial promissor para um possível alvo terapêutico da obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-QASSAB, H. et al. Dominant role of the p110beta isoform of PI3K over p110alpha in energy homeostasis regulation by POMC and AgRP neurons. *Cell Metab*, v. 10, n. 5, p. 343-54, Nov 2009.
- AREIAS, M. F.; PRADA, P. O. Mechanisms of insulin resistance in the amygdala: influences on food intake. *Behav Brain Res*, v. 282, p. 209-17, Apr 2015.
- BELGARDT, B. F.; BRUNING, J. C. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1212, p. 97-113, Nov 2010.
- BELGARDT, B. F. et al. PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab*, v. 7, n. 4, p. 291-301, Apr 2008.
- BERRINGTON DE GONZALEZ, A. et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*, v. 363, n. 23, p. 2211-9, Dec 2010.
- BINGHAM, N. C. et al. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology*, v. 149, n. 5, p. 2138-48, May 2008.
- CASTRO, G. et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. *FEBS Open Bio*, v. 3, p. 443-9, 2013.
- CLEMENT, K. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, v. 392, n. 6674, p. 398-401, Mar 26 1998.
- CONTRERAS, C. et al. The brain and brown fat. *Annals of Medicine*, p. 150-168, Jun, 2014.
- COPPARI, R. et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab*, v. 1, n. 1, p. 63-72, Jan 2005.
- DHILLON, H. et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, v. 49, n. 2, p. 191-203, Jan 2006.
- DUNCAN, P. I. et al. The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res*, v. 241, n. 2, p. 300-8, Jun 15 1998.
- FUKUDA, M. et al. Monitoring FoxO1 localization in chemically identified neurons. *J Neurosci*, v. 28, n. 50, p. 13640-8, Dec 10 2008.
- GONG, L. et al. Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology*, v. 149, n. 7, p. 3346-54, Jul 2008.
- HATTING, M. et al. Adipose Tissue CLK2 Promotes Energy Expenditure during High-Fat Diet Intermittent Fasting. *Cell Metab*, v. 25, n. 2, p. 428-437, Feb 2017.
- HILL, J. W. et al. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest*, v. 118, n. 5, p. 1796-805, May 2008.

HU, F. B. et al. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med*, v. 351, n. 26, p. 2694-703, Dec 23 2004.

INGALLS, A. M.; DICKIE, M. M.; SNELL, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, v. 41, n. 12, p. 317-8, Dec 1950.

KIEVIT, P. et al. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab*, v. 4, n. 2, p. 123-32, Aug 2006.

KIM, M. S. et al. Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nat Neurosci*, v. 9, n. 7, p. 901-6, Jul 2006.

KIM, Y. B. et al. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*, v. 141, n. 7, p. 2328-39, Jul 2000.

KITAMURA, T. et al. Forkhead protein FoxO1 mediates AgRP-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med*, v. 12, n. 5, p. 534-40, May 2006.

KLOCKENER, T. et al. High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat Neurosci*, v. 14, n. 7, p. 911-8, Jul 2011.

KONNER, A. C. et al. Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell Metab*, v. 13, n. 6, p. 720-8, Jun 8 2011.

KONNER, A. C.; KLOCKENER, T.; BRUNING, J. C. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav*, v. 97, n. 5, p. 632-8, Jul 14 2009.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*, v. 47, n. 1, p. 69-85, Jan 1970.

LAGE, R. et al. Contribution of adaptive thermogenesis to the hypothalamic regulation of energy balance. *Biochem J*, v. 473, n. 22, p. 4063-4082, Nov 2016.

LEE, P. et al. Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans. *Cell Metab*, v. 23, n. 4, p. 602-9, Apr 2016.

MCLELLAN, M.A., ROSENTHAL, N.A., PINTO, A.R. Cre-loxP-mediated recombination: general principles and experimental considerations. *Curr. Prot. Mouse Bio.*, v.7, p.1-12, Mar 2017.

MESAROS, A. et al. Activation of Stat3 signaling in AgRP neurons promotes locomotor activity. *Cell Metab*, v. 7, n. 3, p. 236-48, Mar 2008.)

MINOKOSHI, Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, v. 428, n. 6982, p. 569-74, Apr 2004.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, v. 443, n. 7109, p. 289-95, Sep 2006.

MORTON, G. J.; SCHWARTZ, M. W. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 25 Suppl 5, p. S56-62, Dec 2001.

MORTON, G. J.; SCHWARTZ, M. W. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev*, v. 91, n. 2, p. 389-411, Apr 2011.

NAM, S. Y. et al. Phosphorylation of CLK2 at serine 34 and threonine 127 by AKT controls cell survival after ionizing radiation. *J Biol Chem*, v. 285, n. 41, p. 31157-63, Oct 2010.

NISWENDER, K. D. et al. Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 3-kinase activation by insulin and leptin. *J Histochem Cytochem*, v. 51, n. 3, p. 275-83, Mar 2003.

NISWENDER, K. D. et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes*, v. 52, n. 2, p. 227-31, Feb 2003.

NISWENDER, K. D. et al. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*, v. 413, n. 6858, p. 794-5, Oct 25 2001.

OBICI, S. et al. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*, v. 8, n. 12, p. 1376-82, Dec 2002.

OLSHANSKY, S. J. et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*, v. 352, n. 11, p. 1138-45, Mar 17 2005.

PARDINI, A. W. et al. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res*, v. 1112, n. 1, p. 169-78, Sep 27 2006.

PISCHON, T. et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*, v. 359, n. 20, p. 2105-20, Nov 13 2008.

POCAI, A. et al. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab*, v. 1, n. 1, p. 53-61, Jan 2005.

QUARESMA, P. G. et al. Cdc2-like kinase 2 in the hypothalamus is necessary to maintain energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*, v. 41, n. 2, p. 268-278, Feb 2017.

RING, L. E.; ZELTSER, L. M. Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. *J Clin Invest*, v. 120, n. 8, p. 2931-41, Aug 2010.

RODGERS, J. T. et al. Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis. *Cell Metab*, v. 11, n. 1, p. 23-34, Jan 2010.

SASAKI, T.; KITAMURA, T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. *Endocr J*, v. 57, n. 11, p. 939-46, 2010.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 6 2000.

SPERRIN, M. et al. Slowing down of adult body mass index trend increases in England: a latent class analysis of cross-sectional surveys (1992-2010). *Int J Obes (Lond)*, v. 38, n. 6, p. 818-24, Jun 2014.

STAMLER, R. et al. Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *JAMA*, v. 240, n. 15, p. 1607-10, Oct 6 1978.

TABATA, M. et al. Cdc2-like kinase 2 suppresses hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis through disruption of the PGC-1 α and MED1 complex. *Diabetes*, v. 63, n. 5, p. 1519-32, May 2014.

VAN DE WALL, E. et al. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology*, v. 149, n. 4, p. 1773-85, Apr 2008.

VAN DER KLAUW, A. A.; FAROOQI, I. S. The hunger genes: pathways to obesity. *Cell*, v. 161, n. 1, p. 119-32, Mar 2015.

WATERSON, M. J.; HORVATH, T. L. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab*, v. 22, n. 6, p. 962-70, Dec 2015.

WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, v. 40 Suppl 2, p. S2-17, Jul 1997.

WOODS, S. C. et al. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol*, v. 51, p. 255-77, 2000.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition*, v. 16, n. 10, p. 894-902, Oct 2000.



CEUA/Unicamp

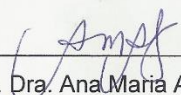
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

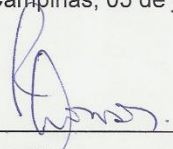
Certificamos que o projeto "EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DA PROTEÍNA CLK2 EM NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE CAMUNDONGOS OBESOS" (protocolo nº 2726-1), sob a responsabilidade de PROFA. DRA. PATRÍCIA DE OLIVEIRA PRADA / PAULA GABRIELE FERNANDES QUARESMA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de junho de 2012.

Campinas, 05 de junho de 2012.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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

Anexo B

9/15/2017

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Cdc2-like kinase 2 in the hypothalamus is necessary to maintain energy homeostasis
Author: P G F Quaresma, L Weissmann, T M Zanotto, A C Santos, A H B de Matos et al.

Publication: International Journal of Obesity

Publisher: Nature Publishing Group

Date: Oct 13, 2016

Copyright © 2016, Rights Managed by Nature Publishing Group

LOGIN

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

Author Request

If you are the author of this content (or his/her designated agent) please read the following. If you are not the author of this content, please click the Back button and select an alternative [Requestor Type](#) to obtain a quick price or to place an order.

Ownership of copyright in the article remains with the Authors, and provided that, when reproducing the Contribution or extracts from it, the Authors acknowledge first and reference publication in the Journal, the Authors retain the following non-exclusive rights:

- To reproduce the Contribution in whole or in part in any printed volume (book or thesis) of which they are the author(s).
- They and any academic institution where they work at the time may reproduce the Contribution for the purpose of course teaching.
- To reuse figures or tables created by them and contained in the Contribution in other works created by them.
- To post a copy of the Contribution as accepted for publication after peer review (in Word or Text format) on the Author's own web site, or the Author's institutional repository, or the Author's funding body's archive, six months after publication of the printed or online edition of the Journal, provided that they also link to the Journal article on NPG's web site (eg through the DOI).

NPG encourages the self-archiving of the accepted version of your manuscript in your funding agency's or institution's repository, six months after publication. This policy complements the recently announced policies of the US National Institutes of Health, Wellcome Trust and other research funding bodies around the world. NPG recognises the efforts of funding bodies to increase access to the research they fund, and we strongly encourage authors to participate in such efforts.

Authors wishing to use the published version of their article for promotional use or on a web site must request in the normal way.

If you require further assistance please read NPG's online [author reuse guidelines](#).

For full paper portion: Authors of original research papers published by NPG are encouraged to submit the author's version of the accepted, peer-reviewed manuscript to their relevant funding body's archive, for release six months after publication. In addition, authors are encouraged to archive their version of the manuscript in their institution's repositories (as well as their personal Web sites), also six months after original publication.

v2.0

BACK

CLOSE WINDOW

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet#formTop>

1/2