

Juliana Contin Moraes

**APOPTOSE DE NEURÔNIOS HIPOTALÂMICOS EM
RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

CAMPINAS

2009

Juliana Contin Moraes

**APOPTOSE DE NEURÔNIOS HIPOTALÂMICOS EM
RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

*Tese de doutorado apresentada á Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de Ciências Básicas.*

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

2009

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

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

M791a Moraes, Juliana Contin
Apoptose de neurônios hipotalâmicos em ratos alimentados com
dieta hiperlipídica / Juliana Contin Moraes. Campinas, SP : [s.n.],
2009.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Apoptose. 2. Hipotálamo. 3. Obesidade. I. Velloso, Lício
Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Apoptosis in hypothalamic neurons from rats fed high-fat
diet**

Keywords: • Apoptosis
• Hypothalamus
• Obesity

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
Prof. Dr. Aníbal Vercesi
Prof. Dr. Francesco Langone
Profa. Dra. Eliane Beraldi Ribeiro
Profa. Dra. Silvana Bordin

Data da defesa: 20-03-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Juliana Contin Moraes

Orientador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Membros:

1. Prof. Dr. Aníbal Eugenio Vercesi

2. Prof^a. Dr^a. Eliane Beraldi Ribeiro

3. Prof. Dr. Francesco Langone

4. Prof^a. Dr^a. Silvana Bordin

5. Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

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

Data: 20/03/2009

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

Dedicatória

Aos meus pais

Vocês me fizeram chegar até aqui...

Agradecimentos

Professor Lício, nosso grande “paizão”...paciente, atencioso, extremamente competente. Nos ensinou muito, não só no campo da Ciência, mas na vida também. Agradeço por ter acreditado em mim, em toda essa jornada.

Marcos e Yolanda, minhas fortalezas, minha vida...nunca deixaram de acreditar em mim. Nunca.

Rodrigo, obrigada por toda sua ajuda, tanto nas horas do trabalho, me acompanhando em Natal e Ano-novo nos experimentos de pair-feeding, quanto nas horas que precisei muito de conselhos, de colo e atenção. Obrigado por tudo que me ensinou e por me fazer enxergar direito as coisas.

Ricardo Contarteze, saudade de vc, amigo. Por um breve tempo, me ensinou a ver a beleza da vida, que muitas vezes fica mascarada por bobagens corriqueiras. Estão comigo e sempre estarão nossas conversas, os “sarros” que ele tirava de mim e a impagável frase dita quase sempre quando eu não concordava com ele: “ê Juliana...é bem sua cara mesmo!!” ou as lições que ele me passava em momentos de nervosismo, que sempre me deram força pra acreditar que algo muito bom acontece pra quem se esforça...é só esperar.

Dennys, que figura essa... Surgiu todo tímido e acanhado no laboratório. Mas o tempo passou e vi um companheiro inseparável na vida e na Ciência. Conversamos muito, sempre. Brigamos, trabalhamos, damos risada e pensamos juntos. Dançamos, vibramos, acreditamos. Obrigada Batman! E vamos em frente.

Joseane, Meiga e querida amiga. Dou muita bronca nela, pois ela esconde toda a grandeza que possui. Como é inteligente, bonita e competente; vai arrasar ainda! É só querer. Obrigada por toda a sua ajuda, seus ensinamentos e conversas que tivemos.

Andressa, “Moça bonita!”, como ela mesmo diz. Um dos exemplos que eu tive de bom-humor, alegria e competência no trabalho. Sempre cantava pra mim mesmo nos momentos que eu estava pra baixo: “Samba Juliana, samba Juliana!!”, mas ela nunca demonstrou que poderia estar “down-regulated” também...sempre nos contagiou com sua energia positiva. Obrigada amiga por estar lá, na bancada, tantas vezes comigo.

Érika, mais conhecida como “queridona”. Está comigo desde o cursinho, onde estudamos juntas, entramos na Unicamp e no mesmo laboratório desde o mestrado. Pessoa inigualável, com seu carisma, sua responsabilidade e coragem para enfrentar o que der e vier. Obrigada por tudo!

Gabriela, chegou de mansinho, mas já é das nossas! Companheira de bancada, de almoços, jantares e principalmente, compras! Valeu Gabi! E continuemos na estrada.

Aos meus colegas do laboratório, companheiros que sempre estiveram ao meu lado: Ana Paula, Eliana, Marciane, Talita, Alessandra, Carina e as recém-chegadas Carla, Lívia e Dani Razolli.

Ao Professor Mário Saad, pelos momentos agradáveis que passei em seu laboratório, pelo seu brilhantismo que sempre foi compartilhado e pelos risos que ele me rende até hoje quando fala: “ê Juliana...e a sinalização canônica?” que ele se lembra desde que eu perguntei para ele o que significava esta palavra 20 minutos antes da minha defesa de mestrado, pois eu não lembrava de jeito nenhum!

Aos colegas do laboratório do Prof. Mário Saad e José Barreto, com quem compartilhei muitas risadas, viagens, ensinamentos: Andréia, Eduardo, Rodrigo, Guilherme.

Ao Gérson, por todo seu trabalho para possibilitar que realizássemos os experimentos e por todas os momentos de descontração durante os momentos do café lá no Gastro.

Ao Márcio, “o anjo da guarda dos ratos”, que com toda sua competência, responsabilidade e interesse, possibilitou que nossos animais sempre tivessem o melhor cuidado de todos, levando ao melhor desenvolvimento dos experimentos.

Ao Professor Alexandre Oliveira, do Instituto de Biologia, e seus alunos que sempre foram muito atenciosos comigo e me ensinaram muito sobre o fascinante mundo da Microscopia Eletrônica.

Aos colegas do Biotério: Luís, Srs. Zé e Antônio, por todo o seu trabalho, atenção e ajuda em muitos experimentos.

“Aqueles animais que com os olhos humildes nos falaram de sua vontade de viver; aqueles animais, vítimas solicitadas pela Ciência em benefício da humanidade, o meu respeito e eterna gratidão.”

À FAPESP, por ter possibilitado o desenvolvimento de todo o meu trabalho.

Obrigado!

<u>Sumário</u>	Pág.
RESUMO.....	<i>xii</i>
ABSTRACT.....	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	17
2- OBJETIVOS.....	32
3- CAPÍTULO 1.....	34
 Artigo: High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons	
4- ANEXOS.....	46
Resultados Complementares	
5- CAPÍTULO 2-DISCUSSÃO GERAL.....	53
6- APÊNDICE.....	67
Materiais e Métodos	
7-CONCLUSÕES.....	76
8. BIBLIOGRAFIA.....	78

Abreviaturas

AGRP	<i>Agouti-related protein</i>
AII	Angiotensina II
AKT/PKB	Proteína serina/treonina quinase B
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetracético sódico
ERK	Kinase regulada por sinal extracelular
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
GNSo	S-Nitroso-L-glutationa
ICV	Intracerebroventricular
IKK	Quinase I kappa B ativadora de NFκB
IL1-β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IR	Receptor de insulina
IRS1/2	Substrato do receptor de insulina 1 e 2
IκB	Inibidor I kappa B de NFκB
MCH	Hormônio concentrador de melanina
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico

NPY	Neuropeptídeo Y
PARP	Poly-ADP-ribose polimerase-1
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinase
PMSF	p-metilsulfonil fluoreto
POMC	Neuropeptídeo precursor da pro-opiomelanocortina
REs	Estresse de retículo endoplasmático
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain-reaction</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e sódio docecil-sulfato para eletroforese
SHC	Proteína de transução de sinal <i>SRC homology collagen protein</i>
TNFR	Receptor de TNF
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador de tireotropina
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i>

RESUMO

Durante as últimas décadas tem se observado um aumento surpreendente na prevalência de obesidade e diabetes mellitus em populações de várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. Medidas terapêuticas baseadas em mudanças de hábito alimentar e estilo de vida têm se mostrado ineficazes para conter o avanço destas epidemias. Somente a completa caracterização dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de ambas as condições deverão apontar potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos mais efetivos e de medidas profiláticas mais eficientes. Diversos estudos epidemiológicos apontam o consumo de dietas ricas em lípidos como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de obesidade e diabetes. Em estudo recente realizado por nosso grupo, verificamos por *macroarray* de cDNA que em hipotálamo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica há um aumento na expressão de genes de codificam proteínas participantes de respostas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-1 β . Além disso, ao realizarmos avaliação histológica da expressão de citocinas como TNF- α , no hipotálamo, observamos que o número de neurônios hipotalâmicos estava aparentemente reduzido nos animais tratados com dieta hiperlipídica. Como muitas destas citocinas pró-inflamatórias podem ativar vias apoptóticas decidimos investigar a ocorrência de apoptose de neurônios em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, sendo este o objetivo principal do presente trabalho. Utilizando *real-time PCR*, TUNEL, imunohistoquímica, imunoblot, e microscopia eletrônica de transmissão, observamos que neurônios do hipotálamo são alvos de apoptose. As sub-populações de neurônios preferencialmente afetadas dependem do *background* genético do animal, de tal forma que em animais com baixa predisposição para obesidade, tanto neurônios orexigênicos como anorexigênicos são igualmente afetados, enquanto que em cepas com maior predisposição para obesidade, neurônios anorexigênicos são alvos principais da apoptose. Por fim, revelamos que a presença de receptores TLR4 íntegros protegem neurônios da apoptose, sugerindo que essa via de sinalização do sistema imune inato tem papel duplo, participando da indução de inflamação, mas ao mesmo tempo protegendo neurônios de danos irreversíveis. Acreditamos que tais estudos possam contribuir para que se obtenham avanços na caracterização da fisiopatologia da obesidade e da

participação de fenômenos nutricionais e inflamatórios na regulação funcional do centro regulador da fome e da termogênese.

ABSTRACT

Obesity and diabetes have reached epidemic proportions in several regions of the world. General changes in life-style, including consumption of fat-rich diets, are amongst the most important factors leading to an unprecedented increase in the prevalence of these diseases. The complete characterization of the pathophysiological mechanisms leading to obesity and diabetes may disclose potential targets for the development of specific drugs and development of better prophylactic approaches. Recent work has shown that the consumption of a fat-rich diet for 16 weeks leads to the increased expression of pro-inflammatory cytokines in the hypothalamus, which is accompanied by an apparent reduction in the numbers of neurons in this region. Because many of these cytokines can activate apoptotic pathways we decided to investigate the presence of apoptosis in neurons from rats fed on high-fat diet. Using real-time PCR, TUNEL, immunoblot, immunohistochemistry and transmission electron microscopy we observed increased apoptosis of neurons of the hypothalamus. The subpopulations preferentially affected depend on genetic background. Thus, in a strain genetically protected from obesity, apoptosis affects both, orexigenic and anorexigenic neurons, while in an obesity-prone strain, the anorexigenic neurons are preferentially affected. In addition, we observed that the presence of an intact TLR4 expression protects against apoptosis, suggesting that this receptor of the innate immune system plays a dual role, participating in the activation of an inflammatory response and protecting against further neuronal damage. We believe the present data will contribute to unveil some the pathophysiological mechanisms involved in the development of obesity and the roles played by nutritional and immunological factors in this context.

1. INTRODUÇÃO

Em várias regiões do planeta, obesidade e algumas das doenças comumente associadas a ela, como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e vasculopatia por aterosclerose, são hoje as principais causas de morbidade e mortalidade (Kopelman 2000). Mesmo no Brasil, onde doenças infecciosas e carenciais ainda contribuem para elevada mortalidade precoce, estudos epidemiológicos revelam prevalências de 15 e 9 % para obesidade e diabetes mellitus, respectivamente (Freire, Cardoso et al. 2003). Mais preocupante é o fato que, de acordo com a projeção de um grupo de estudos estratégicos da Organização Mundial de Saúde, caso nenhuma modificação importante das tendências atuais ocorra, as prevalências de obesidade e diabetes mellitus deverão atingir níveis próximos a 25 e 15 %, respectivamente, até o ano 2020 (Friedman 2000; Kopelman 2000).

Obesidade é resultante da quebra do equilíbrio entre ingestão calórica e gasto energético, prevalecendo o primeiro sobre o segundo (Friedman and Halaas 1998; Flier 2004). A adoção de padrões comportamentais que priorizam atividades profissionais sedentárias, e o consumo de dietas industrializadas, ricas em calorias são os principais fatores ambientais associados ao progressivo aumento da prevalência desta doença nos dias atuais. Entretanto, tais fatores levarão ao desenvolvimento do fenótipo de obesidade somente se atuarem sobre alguns determinantes genéticos ainda pouco conhecidos (Schwartz, Woods et al. 2000; Spiegelman and Flier 2001).

A ingestão alimentar e o gasto energético por termogênese são fenômenos fisiológicos controlados através de mecanismos complexos e até certo ponto acoplados entre si (Schwartz, Woods et al. 2000; Spiegelman and Flier 2001; Flier 2004). Em períodos de jejum prolongado, o aumento da sensação de fome é acompanhado por redução da termogênese, o que tem como objetivo poupar energia durante o período de privação

calórica. Uma vez obtido o alimento, a sensação de saciedade será acompanhada de um aumento proporcional do gasto energético por termogênese. Ao prevalecer o equilíbrio entre os componentes deste ciclo, a massa corpórea total, assim como a massa relativa de tecido adiposo, serão mantidas estáveis, sofrendo apenas ligeiras oscilações decorrentes das variações eventuais da composição da dieta; ou ainda, ao longo da vida, decorrente do envelhecimento, que proporciona um lento e gradativo aumento da massa relativa de tecido adiposo. Nestas circunstâncias, obesidade não se instalará. Por outro lado, se a oferta calórica sobrepuser o gasto energético, ocorrerá aumento gradativo da massa corpórea em decorrência do aumento da massa relativa de tecido adiposo, o que levará ao desenvolvimento de obesidade (Schwartz, Woods et al. 2000; Spiegelman and Flier 2001; Flier 2004).

Na última década observou-se um aumento surpreendente do conhecimento científico a respeito dos fenômenos que participam do controle neural da fome e da termogênese (Flier 2004). O ponto de partida para tais avanços foi a caracterização do hormônio leptina pelo grupo do pesquisador J. M. Friedman (Zhang, Proenca et al. 1994); (Friedman and Halaas 1998). A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco em quantidade diretamente proporcional à massa total deste tecido. Os principais sítios de ação da leptina são neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (Friedman and Halaas 1998; Flier 2004). Para alcançar tais neurônios a leptina atravessa a barreira hemato-encefálica utilizando um sistema saturável de transporte mediado por receptores (Schwartz, Woods et al. 2000). Pelo menos dois grupos distintos de neurônios estão presentes no núcleo arqueado, ambos possuindo receptores para leptina. São eles; neurônios produtores dos neurotransmissores NPY e AGRP (NPY/AGRPérgicos), e neurônios produtores dos neurotransmissores POMC e CART (POMC/CARTérgicos).

Além de expressarem receptores para leptina, tais grupos de neurônios expressam também receptores para insulina, hormônio este que desempenha um papel fundamental na modulação da ação da leptina (Schwartz, Woods et al. 2000).

Estudos realizados na segunda metade da década de 1990 revelaram que tanto a leptina quanto a insulina, mas principalmente ambos, agindo de forma combinada, têm a capacidade de inibir neurônios NPY/AGRPérgicos e ativar neurônios POMC/CARTérgicos (Schwartz, Woods et al. 2000; Carvalheira, Siloto et al. 2001; Torsoni, Carvalheira et al. 2003). Neurônios NPY/AGRPérgicos encontram-se ativados durante períodos de jejum ou quando a massa total de tecido adiposo está reduzida. Nestas circunstâncias conexões axonais entre neurônios do núcleo arqueado e neurônios dos núcleos paraventricular e hipotalâmico lateral levam à inibição da produção de neurotransmissores anorexigênicos e ativadores da termogênese (TRH e CRH) no núcleo paraventricular, e ativação da produção de neurotransmissores orexigênicos e inibidores da termogênese (orexina e MCH) no núcleo hipotalâmico lateral. O resultado desta regulação é o aumento da fome e a redução da termogênese. Por outro lado, em períodos pós-prandiais ou quando estoques de energia no tecido adiposo são satisfatórios, há aumento dos níveis sanguíneos de insulina e leptina, o que leva à inibição dos neurônios NPY/AGRPérgicos e ao estímulo dos neurônios POMC/CARTérgicos. O resultado é a inibição de neurônios do núcleo hipotalâmico lateral, produtores de orexina e MCH e estímulo de neurônios do núcleo paraventricular, produtores de CRH e TRH. Ocorrerá então saciedade acompanhada de aumento da termogênese (Schwartz, Woods et al. 2000; Flier 2004).

As diversas evidências a respeito de um *cross-talk* entre as vias de sinalização da insulina e da leptina, não apenas no hipotálamo, mas também em tecidos periféricos (Carvalheira, Siloto et al. 2001; Carvalheira, Ribeiro et al. 2003); como também a comum

associação epidemiológica entre obesidade e diabetes mellitus, logo despertaram o interesse a respeito de possíveis mecanismos de resistência hipotalâmica à sinalização da insulina e leptina como participantes da gênese da obesidade, de forma similar ao já conhecido fenômeno da resistência periférica à insulina participando da gênese do diabetes mellitus tipo 2 (Flier 2004). Uma vez que, estímulos gerados pela sinalização da leptina e insulina no hipotálamo levam a saciedade acompanhada do aumento da termogênese, fica evidente que a eventual resistência à sinalização molecular destes hormônios deva favorecer o aumento da fome e a redução da termogênese e, portanto, predispor à obesidade (Friedman and Halaas 1998; Schwartz and Kahn 1999; Torsoni, Carvalheira et al. 2003; Flier 2004).

Fenômenos moleculares participantes dos mecanismos que levam à resistência à insulina vêm sendo estudados há mais de 20 anos. A redução da fosforilação em resíduos tirosina induzida por insulina, que se detecta em receptores de insulina e seus principais substratos primários como IRS-1, IRS-2 e Shc, são os marcadores moleculares mais evidentes do fenômeno da resistência (Saltiel and Kahn 2001). Tal redução de fosforilação é associada ao aumento da ação de fosfatases, à redução da expressão das proteínas fosforiláveis ou ainda, de acordo com estudos mais recentes, à ativação de serina-quinases, que agindo sobre substratos da via de sinalização da insulina, induzem a sua fosforilação em serina, o que compromete sua ativação através da fosforilação em tirosina (Saltiel and Kahn 2001).

Em animais manipulados geneticamente nos quais a expressão de algumas fosfatases foi abolida, observou-se um aumento da ação da insulina, e inclusive, a não progressão para diabetes em animais geneticamente predispostos para este fenótipo. Não apenas a ablação gênica de fosfatases, mas também a redução transitória de sua expressão

utilizando oligonucleotídeos antisense reverte o quadro de resistência à ação da insulina em animais (Baumgartener 2003; Harley and Levens 2003).

Com relação ao papel exercido pela modulação da quantidade de algumas proteínas participantes da via de sinalização da insulina, tanto em animais manipulados geneticamente nos quais se aboliu a expressão, desde o receptor de insulina e seus substratos proximais, até proteínas envolvidas em etapas mais distais da via; como ainda, em modelos animais que espontaneamente se tornam resistentes à insulina ou desenvolvem diabetes, demonstrou-se que a redução da expressão de proteínas que participam de etapas fundamentais da transdução do sinal da insulina resulta em perdas funcionais consideráveis, levando a fenótipos que variam desde leve resistência à insulina até a resistência absoluta com comprometimento da sobrevivência do animal (Mauvais-Jarvis and Kahn 2000; Araujo, De Souza et al. 2005).

O ponto de partida para a caracterização do efeito inibitório induzido pela fosforilação em serina de proteínas participantes da via de sinalização da insulina foi o reconhecido papel do status infeccioso/inflamatório sobre a ação da insulina. Há muito se observava que, pacientes ou animais experimentais com diabetes mellitus, ao desenvolverem quadros infecciosos ou inflamatórios graves, apresentavam significativo comprometimento da ação da insulina mensurável pela redução do *clearance* de glicose induzido por este hormônio (McCowen, Malhotra et al. 2001). Durante a instalação e progressão do quadro infeccioso/inflamatório há produção e secreção de uma série de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Tais citocinas cumprem o papel primário de mediar a ativação de elementos do sistema imune participantes da resposta ao agente ou mecanismo agressor. Entretanto, agindo em células musculares, hepáticas e no

tecido adiposo, tais citocinas ativam vias pró-inflamatórias que culminam com a modulação negativa da via de sinalização da insulina, a qual, encontra em células destes tecidos, seus principais alvos metabólicos (Hotamisligil 2003).

O TNF- α age através de dois receptores distintos denominados TNFR1 e TNFR2 (MacEwan 2002). Tais receptores apresentam algum grau de homologia na sua porção extracelular, sítio de ligação da citocina, porém na sua porção intracelular são completamente distintos, o que indica que cumprem funções particulares (MacEwan 2002). Agindo através de TNFR1, TNF- α ativa substratos intracelulares que participam do controle da transcrição de genes de resposta inflamatória, modula proteínas participantes do controle de apoptose e regula respostas de crescimento e diferenciação celular (Gupta 2002; MacEwan 2002). Um dos principais substratos intermediários da via de sinalização do TNF- α é a serina quinase JNK (Dempsey, Doyle et al. 2003). Uma vez ativada, a JNK tem a função primária de induzir a associação dos produtos dos genes de resposta imediata c-Jun e c-Fos, levando à formação do fator de transcrição dimérico AP-1 (Dempsey, Doyle et al. 2003). Entretanto, a atividade serina quinase de JNK pode incidir sobre outros substratos, inclusive os substratos tradicionais do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 (Hotamisligil 2003). Uma vez fosforilados em serina pela JNK a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina através desta via.

Outra via pró-inflamatória que pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via IKK/I κ B/NF- κ B (Shoelson, Lee et al. 2003). Esta via pode ser ativada pelo TNF- α , mas também por outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (Shoelson, Lee et al. 2003). A ativação de IKK promove a dissociação do complexo

I κ B/NF κ B mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IRSs o que compromete a transdução do sinal da insulina através desta cascata. A inibição da ativação da via IKK/I κ B/NF- κ B com uso do anti-inflamatório ácido acetil salicílico (AAS) reverte a resistência à insulina induzida por sinais pró-inflamatórios ou por sepse (Yuan, Konstantopoulos et al. 2001; Shoelson, Lee et al. 2003; Barreiro, Prattali et al. 2004).

Durante os últimos anos evidências experimentais e clínicas têm revelado que além de sua função primordial como órgão de estoque de energia, o tecido adiposo desempenha função endócrina e moduladora da resposta imune (Hotamisligil 2000). A primeira função pode ser exemplificada pela ação da leptina que participa de mecanismos de sinalização que informam ao hipotálamo a respeito dos estoques periféricos de energia, e que permitem que se regule adequadamente as repostas de fome e termogênese (Flier 2004). Além disso, outros hormônios como a adiponectina e a resistina carregam informações do tecido adiposo para outros órgãos metabolicamente ativos como músculo esquelético e fígado (Kershaw and Flier 2004). A segunda função é exemplificada pela produção, pelo tecido adiposo, de citocinas pró-inflamatórias, numa quantidade diretamente proporcional à sua massa (Kershaw and Flier 2004). Entre estas citocinas encontram-se TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que, como discutido acima, participam de complexos mecanismos que regulam negativamente a sinalização da insulina no próprio tecido adiposo, além de músculo e fígado (Hotamisligil 2000; Kershaw and Flier 2004). Tais achados estabeleceram uma ligação molecular entre o aumento da massa de tecido adiposo durante o desenvolvimento de obesidade e o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes.

Apesar dos importantes avanços obtidos na caracterização da resistência periférica à ação da insulina, pouco se avançou na compreensão dos mecanismos que levam a um

desajuste do intrincado sistema de controle e acoplamento funcional entre fome e termogênese pelo sistema nervoso central. Partindo-se do paradigma que coloca a leptina e a insulina numa posição central como carreadores da informação a respeito dos níveis de estoques periféricos de energia, é possível que defeitos da transdução do sinal destes hormônios no hipotálamo, similares àqueles que participam do desencadeamento da resistência à ação da insulina em adiposo, fígado e músculo, possam concorrer para o desajuste no balanço entre controle da aquisição de energia e controle autônomo do gasto de energia.

Para tentar obter avanços na compreensão de fenômenos moleculares envolvidos com a gênese da obesidade e diabetes mellitus realizamos, em estudo recente, a avaliação do papel de uma dieta rica em lípidos sobre a expressão de múltiplos genes em hipotálamo. Inúmeros estudos epidemiológicos e experimentais revelam que a exposição prolongada de seres humanos ou animais experimentais a dietas ricas em lípidos promove ganho de peso, aumento da massa relativa de tecido adiposo, resistência à insulina e em indivíduos geneticamente predispostos, diabetes mellitus (Prentice and Jebb 2003; Shoelson, Lee et al. 2003). Desta forma, animais experimentais, não geneticamente manipulados e sem predisposição ao desenvolvimento de diabetes mellitus foram tratados por 16 semanas com uma dieta rica em lípidos, seguindo padrões previamente estabelecidos (El-Haschimi, Pierroz et al. 2000). Ao final do período experimental os animais foram anestesiados e o hipotálamo foi obtido para extração de RNA. O RNA foi utilizado em procedimento de transcrição reversa e o cDNA obtido foi utilizado para hibridização em membranas de *Macroarray* (Atlas Arrays, Rat 1.2 Array, Clontech). Através deste método foram avaliados simultaneamente 1176 especificidades de mRNA. Entre estes existiam mRNAs

codificadores de hormônios, citocinas, fatores de crescimento, neurotransmissores, proteínas transportadoras, receptores de membrana, receptores nucleares, moléculas de sinalização celular, transportadores de membrana, fatores e co-fatores de transcrição, enzimas de vias metabólicas, controladores de ciclo celular, proteínas estruturais entre outros (De Souza, Araujo et al. 2005). A dieta hiperlipídica promoveu a modulação positiva ou negativa de 170 especificidades de mRNA. Houve regulação de mRNAs codificadores de proteínas de várias categorias, variando desde hormônios e receptores de hormônios até enzimas, proteínas envolvidas com sinalização celular, fatores de transcrição entre outros. Entretanto, como grupo isolado, citocinas e proteínas participantes de resposta pró-inflamatória, foram aquelas que sofreram numericamente, maior modulação.

De acordo com o nosso estudo (De Souza, Araujo et al. 2005) e com o Editorial (Kohn, Wallace et al. 2005) publicado a respeito dele, o fenômeno pró-inflamatório no hipotálamo ativa as vias de sinalização inflamatórias da JNK e NF κ B em neurônios do núcleo arqueado e do hipotálamo lateral. Proteínas com atividade serina-quinase presentes nestas vias catalisam a fosforilação em serina de importantes participantes da via de sinalização da insulina o que leva a uma resistência molecular à ação deste hormônio no hipotálamo de animais alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento destes animais com um composto que inibe a ação da JNK, reduz a fosforilação em serina do receptor de insulina e do IRS-2 e atenua os efeitos da ingestão da dieta hiperlipídica sobre a fome e o ganho de peso. Portanto este estudo revela um novo mecanismo pós-receptor que pode participar da gênese da obesidade por induzir resistência hipotalâmica à ação de hormônios adipostáticos.

Outro fenômeno interessante observado neste estudo foi uma aparente redução do número relativo de neurônios nos núcleos arqueado e lateral do hipotálamo de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Como muitas destas vias pró-inflamatórias podem também ativar fenômenos pró-apoptóticos decidimos investigar a eventual presença e os possíveis mecanismos moleculares envolvidos com apoptose em hipotálamo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

Apoptose ou morte celular programada é um fenômeno biológico comum a todos os organismos multicelulares (Danial and Korsmeyer 2004). Pode ser gerada por vários fatores, incluindo radiação ultravioleta, irradiação γ , ausência de fatores de crescimento, drogas quimioterápicas ou sinalização por meio de receptores de morte (Ashkenazi and Dixit 1998).

A apoptose é definida tendo como base algumas características morfológicas que podem ser vistas no momento em que a célula está morrendo, sendo elas: condensação e fragmentação nuclear, formação de “bolhas” na membrana, fragmentação celular formando corpos apoptóticos, fagocitose da célula e ausência de resposta inflamatória subsequente (Wyllie, Kerr et al. 1980). O desfecho final, qual seja, a morte por apoptose, é geralmente o resultado da ativação de um conjunto de caspases, em particular as caspases 3, 6 e 7, também chamadas de executoras (Thornberry and Lazebnik 1998; Fuentes-Prior and Salvesen 2004), que são proteases cisteinil aspartato específicas (*cysteinil aspartate-specific proteases*), as quais são sintetizadas como zimógenos com um pró-domínio de comprimento variável seguido de uma grande subunidade (p20) e uma subunidade menor (p10).

As caspases executoras medeiam seus efeitos por clivagem de substratos específicos na célula. Essas caspases e todos os componentes da maquinaria apoptótica, geralmente

pré-existem em células saudáveis em formas inativas. A ativação destas caspases pelas caspases iniciadoras 8, 9 e 10 definem as vias apoptóticas amplamente estudadas: a via intrínseca (ou mitocondrial) e a via extrínseca (dependente da ativação de receptores de morte).

Na via extrínseca, a união de ligantes específicos a receptores de morte (conjunto de receptores pertencentes à família TNFR, como TNFR-1 e CD95) causa o recrutamento e oligomerização da molécula adaptadora FADD dentro do complexo de sinalização de indução de morte (DISC). O FADD oligomerizado se liga às caspases iniciadoras 8 e 10, levando à dimerização e ativação (Bredesen, Rao et al. 2006) e posterior ativação das caspases executoras.

Na via intrínseca, as caspases executoras são clivadas pela caspase iniciadora 9. Como outras caspases iniciadoras, a caspase 9 só pode ser ativada por dimerização na molécula adaptadora Apaf-1. Esta pré-existe no citosol como um monômero, e sua ativação depende da presença do citocromo c. A liberação do citocromo c, que está presente normalmente no espaço intermembranar da mitocôndria, é dependente da permeabilização da membrana mitocondrial externa (*MOMP-mitochondrial outer membrane permeabilization*), que é o evento crítico para a ativação de caspases para a via intrínseca. Uma vez liberado, o citocromo c se une à Apaf-1, induzindo uma mudança conformacional nesta molécula adaptadora (Bao, Riedl et al. 2005). Apaf-1 então se oligomeriza em uma estrutura chamada apoptossomo que recruta e ativa a caspase 9 (Acehan, Jiang et al. 2002).

A indução de MOMP pode ocorrer pela ação das proteínas da família Bcl-2, na membrana mitocondrial externa. Bcl-2 é o protótipo para uma família de genes de mamíferos e de suas proteínas resultantes. Eles regem a permeabilização da membrana mitocondrial externa e podem ser tanto pró-apoptóticos (Bax, Bak e outros) como anti-

apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x_L) (Letai 2005). Os membros desta família dividem domínios de homologia característicos denominados domínios bcl-2 homólogos (domínios BH). Estes são conhecidos por serem cruciais para sua função, tendo em vista que a deleção destes domínios afeta a taxa de sobrevivência/apoptose. Esses domínios também subdividem o grupo pró-apoptótico com muitos domínios BH (Bax e Bak) daqueles com o domínio BH3 apenas (Bid, Bad, Bim). Muitos dos membros desta família possuem domínios transmembrana e o local de ação para essas proteínas é na face externa da membrana mitocondrial (Letai 2005). Dentro desta organela existem fatores pro-apoptogênicos (citocromo c, Omi, SMAC) que se libertados, ativam os executores da apoptose, as caspases (Liu, Kim et al. 1996; Du, Fang et al. 2000; Li, Luo et al. 2001; Kuwana, Mackey et al. 2002).

Elevação dos níveis de ácidos graxos na corrente sanguínea, como ocorre durante o consumo de dietas hiperlipídicas (Shi, Kokoeva et al. 2006), pode ativar vias pró-apoptóticas por diferentes mecanismos. Um desses mecanismos, ainda pouco explorados, decorre da ativação de receptores da família *toll-like* (TLR). Os TLRs emergiram como componentes-chave na detecção de patógenos e na indução de resposta anti-microbiana. Foram originalmente identificados como membros de vias de desenvolvimento da *Drosophila sp*, mas agora os membros da família Toll são reconhecidos como os mais importantes receptores de reconhecimento de componentes moleculares associados a patógenos [PAMP- *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) *recognition receptors* (PRR)]. Existem também os agonistas TLRs endógenos, liberados do próprio organismo, os chamados DAMPs (*damage-associated molecular pattern*), como LDL oxidado, ácidos graxos e fibrinogênio, entre outros, os quais quando reconhecidos podem amplificar

respostas TLR primariamente originadas de componentes exógenos (Vogl, Tenbrock et al. 2007), principalmente através de sinalização TLR 2 e 4 (Beg 2002).

A ativação TLR ativa cascatas de sinalização que convergem para a indução de NF κ B e à iniciação de respostas inflamatórias inatas (Kawai and Akira 2007). Em adição, os TLR influenciam a resposta imune adaptativa indiretamente por modulação da apresentação de antígeno via células dendríticas e diretamente, por modular linfócitos B e T que expressam vários TLR (Xu, Liu et al. 2004). Estudos recentes revelaram a participação dos TLR na apoptose uma vez que muitos genes envolvidos na apoptose são também super-regulados com a sinalização TLR (Eldering, Spek et al. 2003).

Um dos receptores *toll* envolvidos na apoptose é o TLR4, cuja via de indução apoptótica se concentra primordialmente na via extrínseca, baseada nos receptores de morte, culminando na ativação das caspases 8 e 3 (Bannerman, Tupper et al. 2002; Hull, McLean et al. 2002). Mas também é descrito na literatura que esse receptor pode levar ao aumento de Bax em células endoteliais (Munshi, Fernandis et al. 2002), ativar a liberação de citocromo c de mitocôndrias, e, subseqüentemente, levar à ativação de caspase 9 em macrófagos (Hsu, Park et al. 2004). Portanto, se torna difícil determinar uma única via de ativação apoptótica dependente de TLR4, assim como assegurar se as diferentes vias apoptóticas ativadas a partir deste receptor dependem apenas do tipo celular, ou se parâmetros experimentais como o uso de moléculas endógenas *versus* moléculas transfectadas e condições metabólicas também determinem a cascata intracelular que leva à morte celular. O fato é que este receptor está conectado a uma cascata de ativação extremamente rica e pode, potencialmente, estar envolvido no processo aqui estudado.

Dessa forma, no presente estudo, avaliamos, utilizando vários métodos distintos, a indução de apoptose em hipotálamo de ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura saturada, numa tentativa de obter avanços no conhecimento de mecanismos nutricionais e inflamatórios que participam da gênese da obesidade. Avaliamos ainda, a participação de receptores TLR4 nesse processo.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar o efeito do consumo de uma dieta hiperlipídica sobre a indução de apoptose em neurônios do hipotálamo de ratos.

Objetivo específico

- Avaliar a participação do receptor TLR4 no processo de indução da apoptose de neurônios do hipotálamo.

3. CAPÍTULO 1- ARTIGO

High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons

Juliana C. Moraes¹, Andressa Coope¹, Joseane Morari¹, Dennys E. Cintra¹, Erika A. Roman¹, José R. Pauli¹, Talita Romanatto¹, José B. Carvalheira¹, Alexandre L. R. Oliveira², Mario J. Saad¹, Lício A. Velloso^{1*}

1 Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil, **2** Department of Anatomy, University of Campinas, Campinas, Brazil

Abstract

Consumption of dietary fats is amongst the most important environmental factors leading to obesity. In rodents, the consumption of fat-rich diets blunts leptin and insulin anorexigenic signaling in the hypothalamus by a mechanism dependent on the *in situ* activation of inflammation. Since inflammatory signal transduction can lead to the activation of apoptotic signaling pathways, we evaluated the effect of high-fat feeding on the induction of apoptosis of hypothalamic cells. Here, we show that consumption of dietary fats induce apoptosis of neurons and a reduction of synaptic inputs in the arcuate nucleus and lateral hypothalamus. This effect is dependent upon diet composition, and not on caloric intake, since pair-feeding is not sufficient to reduce the expression of apoptotic markers. The presence of an intact TLR4 receptor, protects cells from further apoptotic signals. In diet-induced inflammation of the hypothalamus, TLR4 exerts a dual function, on one side activating pro-inflammatory pathways that play a central role in the development of resistance to leptin and insulin, and on the other side restraining further damage by controlling the apoptotic activity.

Citation: Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, et al. (2009) High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons. PLoS ONE 4(4): e5045. doi:10.1371/journal.pone.0005045

Editor: Xin-Yun Lu, University of Texas Health Science Center, United States of America

Received: October 28, 2008; **Accepted:** March 2, 2009; **Published:** April 2, 2009

Copyright: © 2009 Moraes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de 395 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de 396 Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lavelloso@fcm.unicamp.br

Introduction

Obesity results from an imbalance between caloric intake and energy expenditure. Changes in lifestyle, resulting in increased consumption of dietary fats and reduced physical activity have contributed to the worldwide obesity epidemic [1]. Recent studies have shown that consumption of dietary fats promotes hypothalamic resistance to the main anorexigenic hormones, leptin and insulin, leading to the progressive loss of the balance between food intake and thermogenesis and, therefore, resulting in body mass gain [2–4]. The functional resistance to leptin and insulin in the hypothalamus is a consequence of diet-induced activation of inflammatory signaling, specifically in this site of the brain, which leads to the molecular impairment of leptin and insulin signal transduction by at least four distinct mechanisms; induction of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) expression [5], activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and I kappa kinase (IKK) [3], and induction of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) [6].

Inflammatory and apoptotic pathways are tightly connected and subtle changes in some of the respective determining factors can swing the balance towards one or another outcome [7]. For example, the activation of signal transduction pathways by cytokines such as TNF- α and IL-1 β can lead either to pro-, or anti-apoptotic effects in addition to their classical inflammatory activity [8,9].

Since the balance between survival and loss of hypothalamic neurons may have an impact on the coordinated control of feeding

and thermogenesis [10,11], we decided to evaluate whether the consumption of high amounts of dietary fat can induce apoptosis of cells in this anatomical region. Our results show that neuronal apoptosis is induced by the fat-rich diet and that the presence of a functional TLR4 receptor protects hypothalamic cells from apoptotic damage.

Materials and Methods

Antibodies, chemicals and buffers

The reagents for SDS polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, glycerol and bovine serum albumin (fraction V) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). The reagents for chemiluminescence labeling of proteins in blots were from Amersham (Aylesbury, UK). Antibodies against SOCS3 (rabbit polyclonal, sc-9023), PARP (rabbit polyclonal, sc-7150), Bcl2 (rabbit polyclonal, sc-492), phospho-Bad (pBad) (goat polyclonal, sc-7999), Bax (rabbit polyclonal, sc-493), Apaf1 (goat polyclonal, sc-26685), caspase-9 (rabbit polyclonal, sc-7885), FADD (rabbit polyclonal, sc-5559), caspase-8/p20 (rabbit polyclonal, sc-7890), neuromedin-N (NeuN) (goat polyclonal, sc-7593), phospho-PERK (pPERK) (rabbit polyclonal, sc-32577), PERK (rabbit polyclonal, sc-13073), phospho-eIF2 α (peIF2 α) (rabbit polyclonal, sc-12412), eIF2 α (rabbit polyclonal, sc-11386), I κ B (rabbit polyclonal, sc-1643), NF κ B/p50 (rabbit polyclonal, sc-7178), Myd88 (rabbit polyclonal, sc-11356), phospho-JNK (pJNK)

(rabbit polyclonal, sc-12882), phospho-IKK (pIKK) (rabbit polyclonal, sc-23470), POMC (rabbit polyclonal, sc-20148), AgRP (rabbit polyclonal, sc-18634), TLR4 (rabbit polyclonal, sc-13591), F4/80 (rabbit polyclonal, sc-25830), and FITC or rodamine conjugated goat and rabbit antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The annexin V FITC was produced by the Laboratory of Molecular and Cellular Biology at the Institute of Biomedical Sciences, State University of São Paulo, Brazil. The synaptophysin (rabbit polyclonal, A0010) antibody was from DAKO (Glostrup, Denmark). The caspase-3 antibody was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). The kit for detecting apoptosis by the TUNEL assay was from Upstate Cell Signaling Solutions (Temecula, CA, USA). Chemicals for real-time PCR were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Experimental model and feeding protocols

For most of the experiments, eight-week-old (280–300 g) male Wistar rats were employed. In addition, some experiments were performed with recombinant mice with a loss-of-function mutation for the TLR4 gene (C3H/HeJ) and its respective control (C3H/HeN). In addition, some experiments were performed with male, 8-week old Swiss mice. Rats and Swiss mice were obtained from the University of Campinas Animal Breeding Center, while mutant mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). All the animals were handled according to the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996). All experimental protocols were approved by the University of Campinas Ethics Committee. The rats were always housed in individual cages and maintained on a 12 h-light/dark cycle. After random selection, rats and Swiss mice were submitted for eight weeks to a control or high-fat (HF) diet, as presented in Table 1. The access to diet and water was *ad libitum*. Some rats were submitted to caloric pair feeding for eight weeks. For that, 18.43 g of high-fat chow was offered every day, which provided a mean caloric intake of 4.3 kcal/g body weight, similar to the mean caloric intake of rats fed on the control diet. Eight-week old C3H/HeJ and C3H/HeN mice were randomly selected to either control or HF diet for 8 weeks. At the end of the experimental period, hypothalami were obtained for determination of protein expression and immunohistochemistry.

Intracerebroventricular (icv) cannulation and analysis of leptin and insulin action in the hypothalamus

For the evaluation of leptin- and insulin-induced inhibition of food intake, rats were stereotaxically instrumented using a Stoelting stereotaxic apparatus, according to a previously

described method [12,13]. Coordinates were: anteroposterior, 0.2 mm/lateral, 1.5 mm/depth, 4.0 mm. Procedure efficiency was tested one week after cannulation by the evaluation of the drinking response elicited by icv angiotensin II [12]. After the experiments, cannula placement was also evaluated by histology. For determination of food intake, rats were food deprived for 6 h (from 12 to 18 h) and at 18 h were icv treated with insulin (2.0 μ l, 10^{-6} M), leptin (2.0 μ l, 10^{-6} M), or saline (2.0 μ l). Food ingestion was determined over the next 12 h, during the dark cycle.

Real-time PCR and PCR array

Hypothalamic total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was rendered genomic DNA free by digestion with Rnase-free Dnase (RQ1, Promega, Madison, WI, USA). Samples obtained from three hypothalami from control and HF diet fed rats and Swiss mice were analyzed using a real-time PCR array (RT² profiler PCR array rat apoptosis - SuperArray Bioscience Corp., Frederick, MD, USA) containing 84 apoptosis related genes, as shown in www.superarray.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-012A.html. Real-time PCR analysis of gene expression was carried out in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through seven-point, 3-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR reaction contained 25–30 ng of reverse-transcribed cDNA (depending on the gene). Primers were purchased from Applied Biosystems and were: NPY, Rn00561681_m1; POMC, Rn00595020_m1; TLR4, Rn00569848_m1; F4/80, Rn01527631_m1 Emr1; GAPD, #4352338E, for rat; and, NPY, Mm00445771_m1; POMC, Mm00435874_m1; GAPD #4352339E for mouse. The PCR conditions were 2 min at 50°C; 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. Real-time data were analyzed using the engine provided by Applied Biosystems.

Tissue extraction, immunoprecipitation and immunoblotting

Rats were anesthetized and the hypothalami were dissected and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20 S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9000 \times g in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye binding method. Aliquots of the resulting supernatants containing 2.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against TLR4, Myd88, FADD, Apaf1 and IkB at 4°C overnight, followed by SDS PAGE, transfer to nitrocellulose membranes and blotting with anti-Myd88, TLR4, caspase-8, caspase-9 and NFkB, respectively. In direct immunoblot experiments, 0.2 mg of protein extracts were separated by SDS PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-pJNK, PERK, pPERK, eIF2 α , pEIF2 α , PARP, Bax, Bcl2 antibodies.

Immunohistochemistry

Paraformaldehyde-fixed hypothalami were sectioned (5.0 μ m) and used in regular single- or double-immunofluo-

Table 1. Macronutrient composition of the diets.

	Standard Chow		High-Fat Chow	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	20	19	20	14
Carbohydrate	76	72	45	31
Saturated fat	4	9	35	55
kJ/g	17.5		24.1	

doi:10.1371/journal.pone.0005045.t001

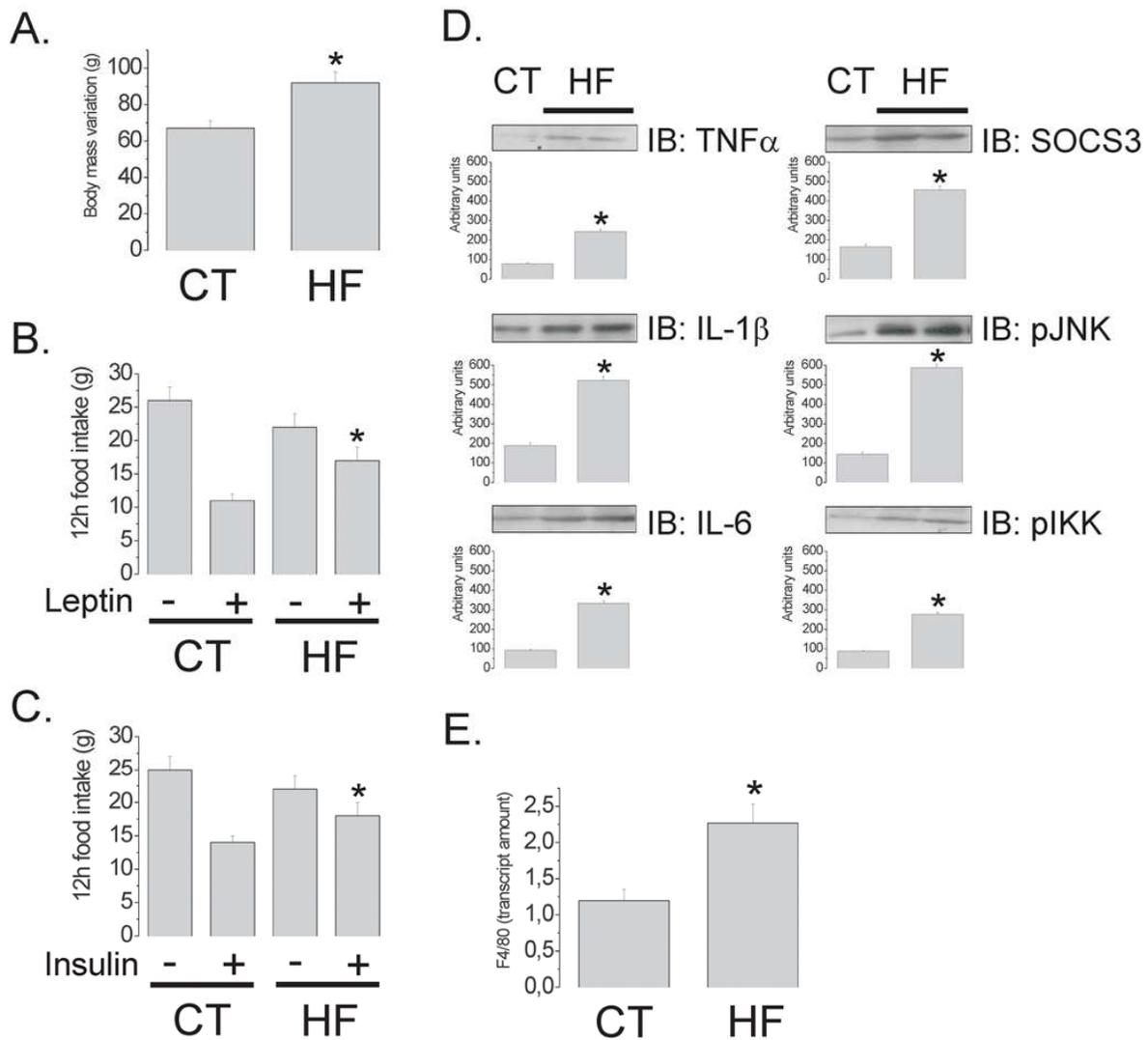


Figure 1. Leptin/insulin resistance and inflammatory markers in the hypothalamus of rats fed on high-fat diet. (A) Body mass variation (g) of Wistar rats fed on control (CT) or high-fat (HF) diets for 8 w. (B–C) Twelve hours spontaneous food intake (g) of Wistar rats fed on CT or HF diets for 8 w and treated icv with a single dose (2.0 μ l) of saline (–), leptin (+, in B) or insulin (+, in C). (D) Immunoblots (IB) of hypothalamic protein extracts obtained from Wistar rats fed on CT or HF diets. (E) Real-time PCR analysis of F4/80 transcript amount in samples obtained from the hypothalami of Wistar rats fed on CT or HF diets. In all experiments $n = 5$. In A, D and E, * $p < 0.05$ vs. CT, values are means \pm SEM; in B and C, * $p < 0.05$ vs. CT+, values are means \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0005045.g001

rescence staining using Bax, Bcl2, pBad, pJNK, pPERK, PERK, eIF2 α , pEIF2 α , TLR4, F4/80, AgRP, POMC, NeuN, caspase-3 and synaptophysin antibodies, as previously described [14,15]. Analysis and documentation of results were performed using a Leica FW 4500 B microscope. The hypothalami were sectioned from Bregma 1,6 to 4,2 mm. Every second of all consecutive section was analyzed. The anatomical correlations were made according to the landmarks given in a stereotaxic atlas [13]. The topographical views of the regions to be studied were obtained by hematoxylin-eosin staining of consecutive sections.

Transmission electronic microscopy (TEM)

Hypothalami from rats fed on control and HF diets were dissected and maintained overnight at 4°C in fixative containing 2.5% glutaraldehyde and 0.5% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). The specimens were then trimmed, dehydrated and embedded in Durcupan (Fluka-Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). Ultrathin sections from the arcuate nucleus were collected on formvar-coated copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a transmission electron microscope (Leo906, Zeiss) operated at 60 KV. Hypothalamus microenvironment was analyzed and

neurons with normal and apoptotic morphology were identified and photographed using a digital image acquisition system (Morada, Zeiss).

TUNEL

A terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay was used to identify double-stranded DNA fragmentation. Briefly, tissue slides were deparaffinized, treated with proteinase K (20 µg/ml) for 15 min at room temperature, and then quenched in 2.0% hydrogen peroxide. After rinsing in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, specimens were incubated in 1× equilibration buffer for 10–15 s. The slides were then incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) for 1.0 h at 37°C, blocked with stop/wash buffer, and incubated with peroxidase antibody for 30 min at room temperature. Negative control for the TUNEL assay was confirmed by staining the tissues in the same manner without primary antibody. Percentages of TUNEL-positive neurons were determined in at least 10 optical fields. Analysis was performed in five 5.0 µm non-consecutive sections from each hypothalamus.

Statistical analysis

Data from the real-time PCR array were analyzed using the engine supplied by the manufacturer. Only mRNAs undergoing at least 2.0-fold variation from control were considered significantly modulated by the diet. Specific bands in immunoblots were scanned and submitted to a quantitative analysis using the Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA). TUNEL positive cells, the apoptotic cells detected in low-magnification TEM and synaptophysin positive nerve terminals were field counted. All these parameters and the metabolic data obtained from the animals were analyzed by the Student's *t*-test.

Results

Initially, we evaluated the effect of the HF diet on the induction of apoptosis in hypothalamic cells. Male Wistar rats were fed control (4% saturated fat, 15.8 kJ/g) or HF (36% saturated fat, 24.5 kJ/g) diets from the 8th to 16th week of life. The HF diet produced a 36±7% (69±3 *vs.* 94±4 g) increase in body mass, as compared to control (*p*<0.05) (Fig. 1A), which was accompanied by functional resistance to icv-injected leptin and insulin, as determined by the capacity of the hormones to inhibit 12-h spontaneous food intake [leptin, 55±8% and 21±5% inhibition in control and HF, respectively (*p*<0.05); insulin, 41±6% and 18±3% in control and HF, respectively (*p*<0.05)] (Fig. 1B–C). In addition, the HF diet led to an increased hypothalamic expression of the inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6, of proteins involved in inflammatory signal transduction, such as SOCS3, pJNK and pIKK (Fig. 1D), and also of a marker of glial cell activation, F4/80 (Fig. 1E). Using a real-time PCR array, we evaluated the quantitative expressions of 84 apoptosis-related genes in the hypothalamus. The HF diet modulated the expressions of 57% of the analyzed targets, suggesting a potent apoptosis/survival regulatory effect. Caspase-6, caspase-8, FADD and TNF-α receptor were some of the pro-apoptotic genes undergoing the greatest increase in the hypothalamus of HF rats, while members of the Bcl and Traf family were some of the anti-apoptotic genes modulated by the HF diet (complete results are shown in Tables 2 and 3, depicting the significantly modulated pro- and anti-apoptotic genes, respectively). Next, employing the TUNEL method, a significant increase in apoptotic cells was

Table 2. Pro-apoptotic genes modulated by HF diet.

Gene	Gene Bank
Apaf-1	NM023979
<i>Bak1</i>	NM053812
<i>Bcl10</i>	NM031328
Bclaf1	XM214967
<i>Bid</i>	NM022684
<i>Bid3</i>	NM057130
Bik	NM053704
Card10	XM243622
<i>Card6</i>	XM226804
Casp1	NM012762
Casp3	NM012922
Casp4	NM053736
Casp6	NM031775
Casp7	NM022260
Casp8	NM022277
Casp9	NM031632
Casp12	NM130422
<i>Dffa</i>	NM053679
Fadd	NM152937
Faslg	NM012908
Mapk8ip	NM053777
Pycard	NM172322
<i>Tnfrsf5</i>	NM134360
Tnfrsf6	NM139194
Tnfrsf10	NM145681
Trp53	NM030989
Trp53bp	XM223012
<i>Trp63</i>	NM019221

Italic, genes undergoing at least a 2-fold decrease in expression, as compared to control. **Bold**, genes undergoing at least a 2-fold increase in expression, as compared to control. Samples obtained from hypothalamus of three controls and three HF rats. Complete list of analyzed genes at www.superarray.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-012A.html. doi:10.1371/journal.pone.0005045.t002

mapped predominantly to the arcuate and lateral hypothalamic nuclei of HF rats [arcuate, 1.9±0.1 *vs.* 14.1±0.4% TUNEL positive cells/field for control and HF, respectively (*p*<0.05); lateral hypothalamus, 2.1±0.1 *vs.* 15.2±0.5% TUNEL positive cells/field for control and HF, respectively (*p*<0.05)] (Fig. 2). Most of the apoptotic cells were neurons, as revealed by transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 3A–F). Field counting in semi-thin sections of TEM revealed a 15.0±1.5% (*p*<0.05) increase in the number of apoptotic cells in HF rats (Fig. 3G), while synaptophysin positive nerve terminals (Fig. 3H) were 3.0±0.02% reduced in HF, as compared to controls (120 observations, *p*<0.05) (Fig. 3I), suggesting a loss of neurons and synaptic inputs. In addition, the preferential targeting of neurons was further confirmed by immunofluorescence double staining for Bax and the neuron specific antigen NeuN (Fig. 3J). Finally, the effect of the diet was site specific since the expression of the apoptotic marker Bax was virtually undetectable by immunohistochemistry in the frontal cortex, occipital cortex, parietal cortex and hippocampus (not shown).

Table 3. Anti-apoptotic genes modulated by HF diet.

Gene	Gene Bank
Api5	XM342470
Bag1	XM216377
Bcl2	NM016993
Bcl2a1	NM133416
Bcl2l1	NM031535
Bcl2l11	NM022612
<i>Birc1b</i>	<i>XM226742</i>
Birc4	NM022231
Bnip	NM080897
<i>Bnip2</i>	<i>XM217191</i>
Bnip3	NM053420
<i>Cflar</i>	<i>NM057138</i>
Dad1	NM138910
Faim	NM080895
Polb	NM017141
Prdx2	NM017169
<i>Prlr</i>	<i>NM012630</i>
Prok2	NM138852
Traf1	AL406530
<i>Traf3</i>	<i>XM343131</i>
Traf4	XM220640

Italic, genes undergoing at least a 2-fold decrease in expression, as compared to control. **Bold**, genes undergoing at least a 2-fold increase in expression, as compared to control. Samples obtained from hypothalamus of three controls and three HF rats. Complete list of analyzed genes at www.superarray.com/rt_pcr_product/HTML/PARN-012A.html. doi:10.1371/journal.pone.0005045.t003

Proteins from both the extra- and intracellular apoptotic pathways were affected by HF diet. The hypothalamic expression of Bax and the association of APAF1 with caspase-9 (Fig. 4A), both commonly involved in intracellular apoptosis routes, and the association of FADD with caspase-8 (Fig. 4A), commonly involved in the induction of apoptosis by the extracellular route were increased in the hypothalamus of HF rats. Further evidence for apoptotic or harmful activity in the hypothalamus was shown by the increased expression of PARP1, and by the phosphorylation of proteins involved in endoplasmic reticulum stress, eIF2 α and PERK (Fig. 4A).

To define whether the pro-apoptotic activity observed in the hypothalamus of HF rats was due to diet composition or caloric intake, randomly-selected rats were submitted to caloric pair-feeding for eight weeks and, at the end of the experimental period, the expression/activation of apoptosis- and endoplasmic reticulum stress-related proteins were evaluated. Pair feeding led to a similar body mass variation as control (Fig. 4B), however, the hypothalamic pro-apoptotic activity was still induced since the FADD/Caspase-8 association was increased, while the I κ B/NF κ Bp50 association was decreased by the HF diet. In addition, the phosphorylation of PERK, a marker of ER stress, was increased by the HF diet (Fig. 4C).

To evaluate whether the apoptotic activity induced by the HF diet would affect differently the neuronal sub-populations of the arcuate nucleus, we performed double-staining immunohistochemistry in hypothalamic samples from Wistar rats and, while in control rats Caspase-3 was not detectable, in HF rats both orexigenic (AgRP, which is co-expressed with NPY) and anorexigenic (POMC) neurons expressed this apoptotic marker (Fig. 5A). This resulted in a significant and similar reduction of expression of NPY and POMC mRNA, as determined by real time PCR (Fig. 5B–C), suggesting that both subpopulations of neurons were equally affected by apoptosis. Since the obesity phenotype exhibited by Wistar rats is not extreme we evaluated

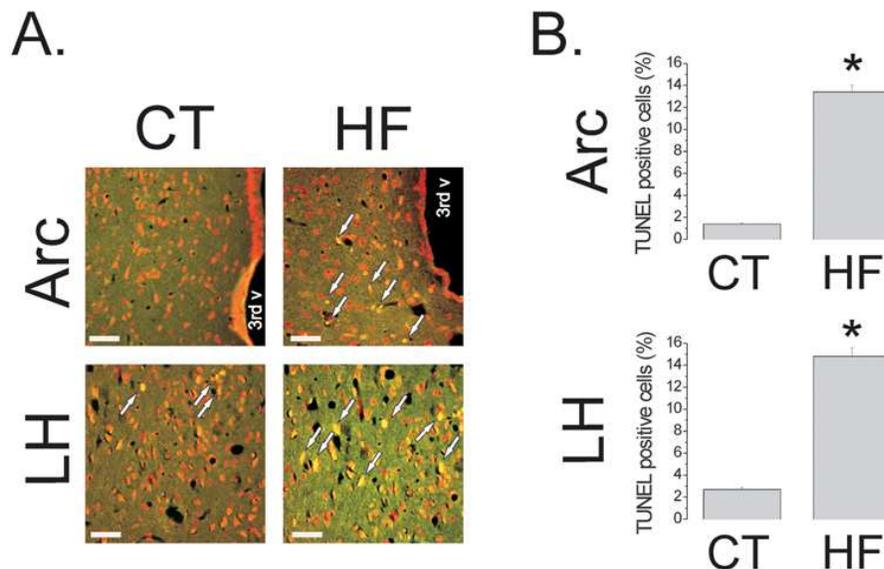


Figure 2. TUNEL assay depicts apoptosis in the hypothalamus of rats fed on high-fat diet. (A) Representative microphotographs of DNA fragmentation detection by TUNEL (stained in yellow) in samples from arcuate (Arc) and lateral hypothalamic (LH) nuclei, from Wistar rats fed on control (CT) or high-fat (HF) diets; the arrows indicate TUNEL positive cells. (B–C) TUNEL positive cells in Arc (B) and LH (C) are expressed as % of total cells per field. In all experiments $n = 5$. In A, magnification, $\times 200$ (scale bar, $20 \mu\text{m}$). In B and C, $*p < 0.05$ vs. CT, values are means \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0005045.g002

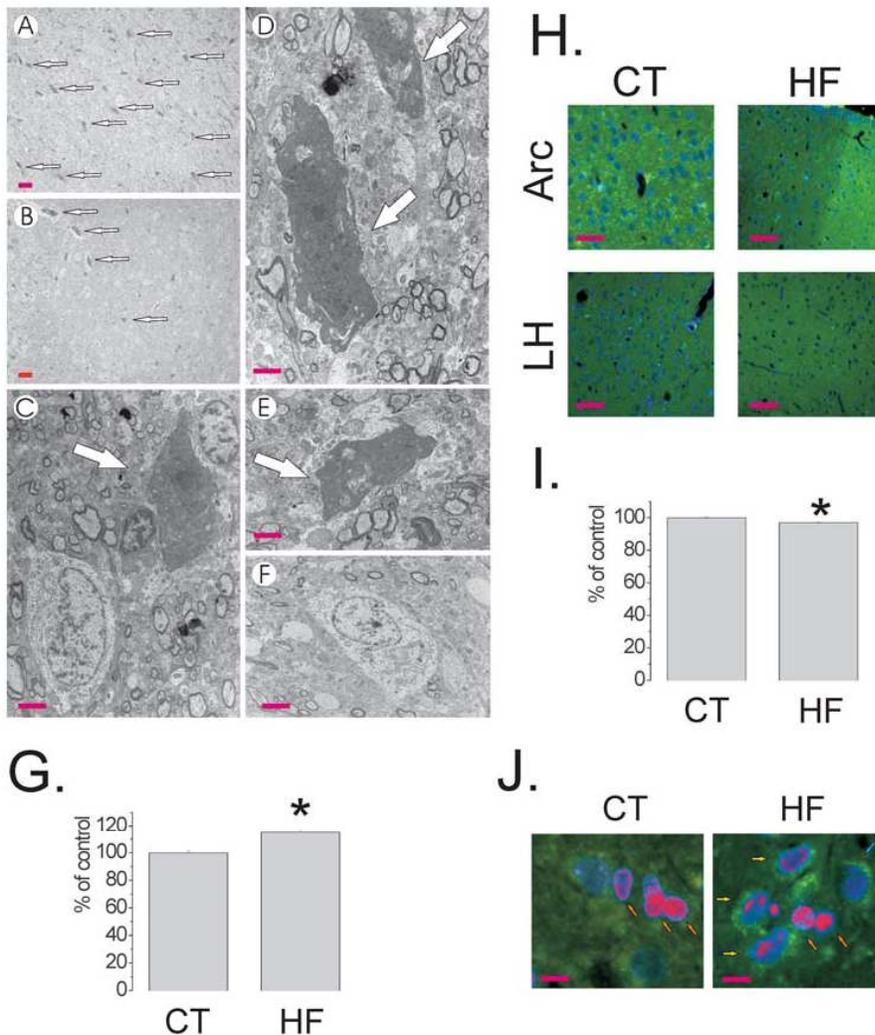


Figure 3. Apoptotic neurons in the hypothalamus of rats fed on high-fat diet. (A–F) Transmission electron microscopy images of typical apoptotic neurons (A–E) and a normal neuron (F) in the arcuate nucleus of Wistar rats fed on high-fat (A, C–E) and control (B, F) diets, respectively. The arrows indicate typical apoptotic neurons. (G) Apoptotic neurons were counted in low magnification fields of transmission electron microscopy analysis from the arcuate nucleus of Wistar rats fed on high-fat (HF) and control (CT) diets, the results are presented as % of CT. (H) Representative synaptophysin immunofluorescence staining of samples from arcuate (Arc) and lateral hypothalamic (LH) nuclei, from Wistar rats fed on CT or HF diets. (I) Synaptophysin positive nerve terminals were field counted and the results are presented as % of CT. (J) Representative NeuN (rhodamine) and Bax (fluorescein) double immunofluorescence staining of samples from hypothalamus of Wistar rats fed on CT and HF diets; orange arrows depict neurons without Bax expression, yellow arrows depict double positive NeuN/Bax stained neurons. A–F are representative of $n=3$; magnification, $\times 100$ (scale bar, $20\ \mu\text{m}$), A–B; and $\times 20,000$ (scale bar, $0.2\ \mu\text{m}$), C–F. G, field counting was performed in five distinct fields from $n=3$; $*p<0.05$ vs. CT. H and J are representative of $n=5$; magnification, $\times 100$ (scale bar, $40\ \mu\text{m}$), H; and $\times 400$ (scale bar, $10\ \mu\text{m}$), J; nuclei are stained in blue by DAPI. I, nerve terminals were counted in 120 distinct fields ($\times 200$ magnification) from $n=5$; $*p<0.05$ vs. CT.
doi:10.1371/journal.pone.0005045.g003

the expression of the neurotransmitters in the hypothalamus of diet-induced obese Swiss mice, which develop a much more pronounced obese phenotype. As shown in Figures 5D–E, in this strain, the consumption of HF diet led to a significant reduction of POMC, but not of NPY expression.

In the last part of the study, we tested the hypothesis that TLR4 could be one of the targets for dietary fats, driving or enhancing the pro-apoptotic stimulus imposed by this environmental factor in the hypothalamus. TLR4 is expressed predominantly in F4/80 positive cells of the hypothalamus (Fig. 6A) and its expression is significantly enhanced in rats fed

on HF diet (Fig. 6B). Mice homozygous for the TLR4 loss-of-function mutation (C3H/HeJ) were fed on HF for 8 w and evaluated for the expression of apoptotic proteins. After 8 w on HF diet, mutant mice gained significantly less ($31\pm 4\%$, $p<0.05$) body mass than controls (C3H/HeN) (Fig. 6C), in spite of a similar food intake (Fig. 6D). However, surprisingly, the expression of Bax and the association of APAF1 with caspase-9 were increased, while the expression of Bcl2 was decreased in the hypothalamus of C3H/HeJ (Fig. 6E); in addition, the association of FADD with caspase-8 was increased (Fig. 6E). The induction of this pro-apoptotic activity was accompanied by the increased

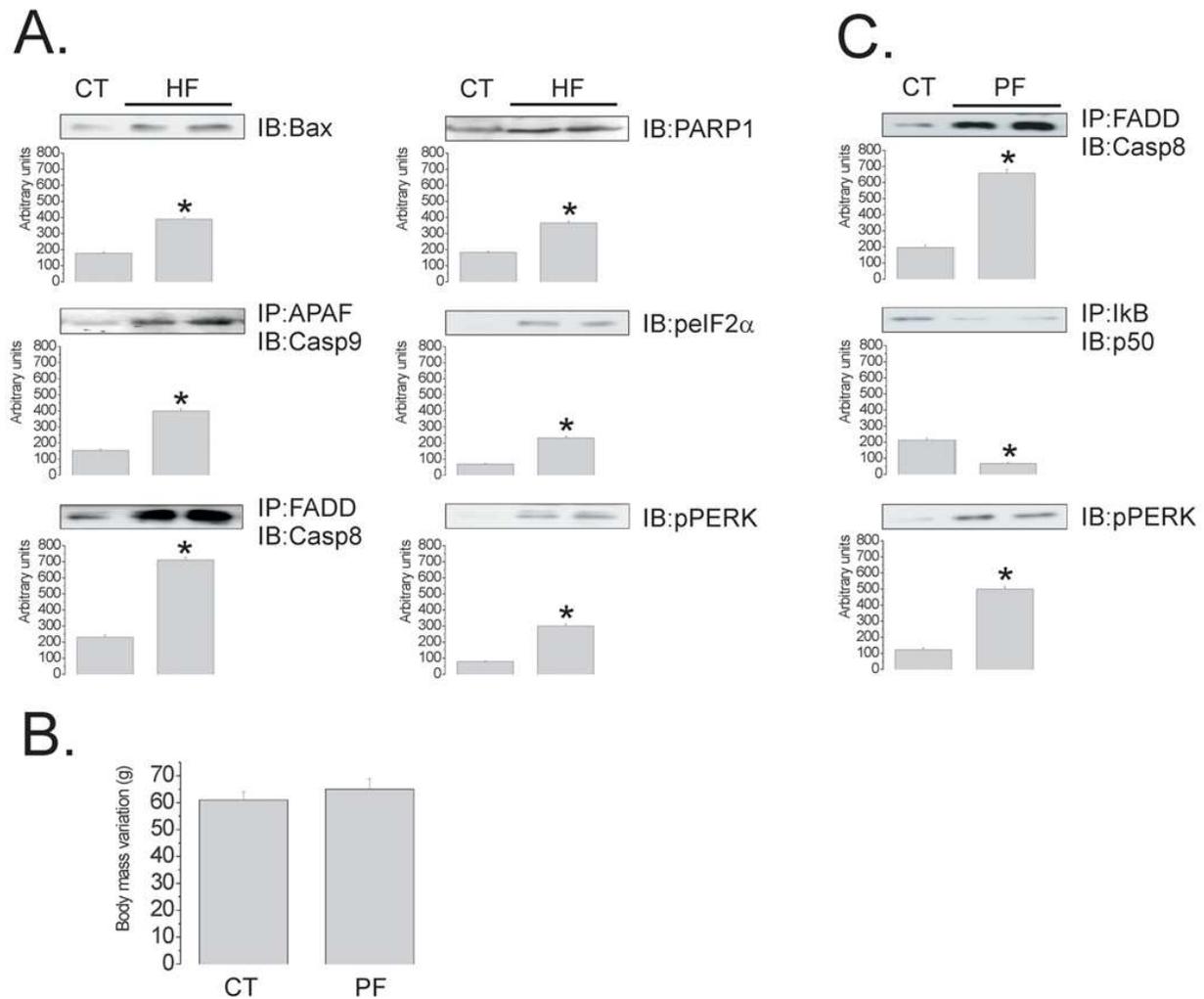


Figure 4. Apoptotic and endoplasmic reticulum stress markers in the hypothalamus of rats fed on high-fat diet. (A and C) Immunoblots (IB) of hypothalamic protein extracts obtained from rats fed control (CT), high-fat (HF) (A) or HF diet in pair-feeding (PF) (C); in some cases samples were submitted to immunoprecipitation (IP) prior to IB. **(B)** Body mass variation (g) of Wistar rats fed on CT or HF diet in pair-feeding (PF) for 8 w. In all experiments, $n=5$; * $p<0.05$ vs. CT. doi:10.1371/journal.pone.0005045.g004

expression of markers of endoplasmic reticulum stress, pJNK and pPERK (Fig. 6E), reinforcing the worsening of the harmful effects of the HF diet in animals lacking a functional TLR4.

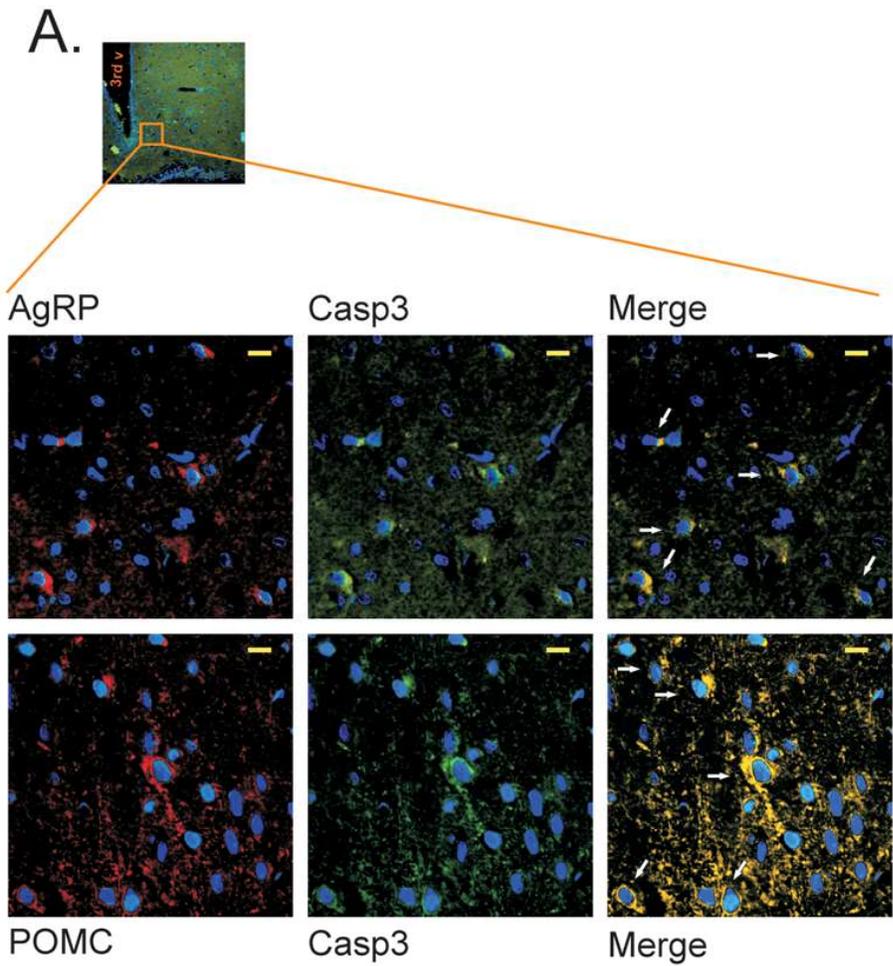
Discussion

Increased consumption of dietary fats is regarded as one of the most important environmental factors predisposing to obesity in modern societies [16]. The ability of dietary fats to promote body mass gain is not exclusively due to its energetic value since prolonged caloric pair-feeding retains most of the obesogenic potential of different high-fat diets [3,17]. Therefore, elucidating the complete mechanisms involved in high fat diet-induced obesity is of major importance to understand the pathophysiology of most cases of human obesity.

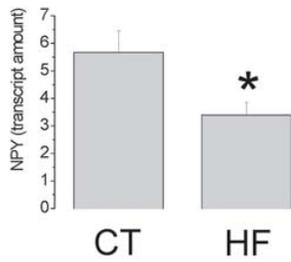
Considerable advance in this field was provided by the recent demonstration of the activation of an inflammatory response in the

hypothalamus of animal models of diet-induced obesity [3,5,18,19]. According to these studies, the consumption of a high-fat diet activates the expression or the activity of inflammatory responsive proteins such as SOCS3, IKK, JNK and PTP1B which impair leptin and insulin signaling in the hypothalamus, thus, disrupting the main satietogenic and adipostatic routes that maintain a stable body mass. The importance of such a mechanism is further illustrated by the fact that both genetic and pharmacological inhibition of inflammatory signaling in the hypothalamus can reverse or prevent the installation of diet-induced obesity [3,5,18,19].

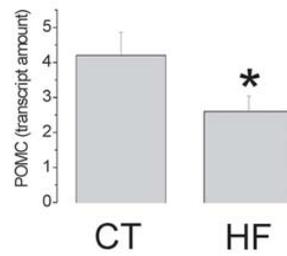
A rather frequent outcome of the activation of inflammatory signal transduction is the induction of pro-apoptotic signaling [7]. Cytokines such as TNF- α and IL-1 β , which are highly expressed in the hypothalami of rodents fed on a high-fat diet [3], can induce apoptosis of different cell types [8]. As an example of this, in a recent study we observed that, upon icv treatment, TNF- α



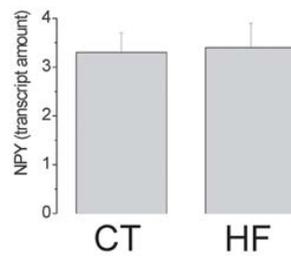
B.



C.



D.



E.

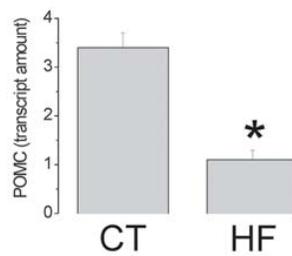


Figure 5. Differences in neuronal subpopulation apoptosis in diet-induced obesity. (A) Representative AgRP (rhodamine) and Caspase-3 (Casp3, fluorescein) (upper panels) or POMC (rhodamine) and Caspase-3 (Casp3, fluorescein) (lower panels) double immunofluorescence staining of samples from hypothalamus of Wistar rats fed on high-fat diet; arrows in merge depict double positive neurons; inset depicts approximate site in the arcuate nucleus that was evaluated in detail. (B–E) Real-time PCR analysis of NPY (B and D) and POMC (C and E) transcript amounts in samples obtained from the hypothalamus of Wistar rats (B–C) and Swiss mice (D–E) fed on control (CT) or high-fat (HF) diets. In all experiments $n = 5$. In A, inset magnification, $\times 20$ and captions magnification, $\times 400$ (scale bar, 10 μm), nuclei are stained in blue by DAPI; 3rd v, third ventricle. In B–E, $*p < 0.05$ vs. CT.

doi:10.1371/journal.pone.0005045.g005

activates apoptotic signaling in the hypothalamus [20]. Therefore, in the first part of the study, we explored the pro-apoptotic potential of the high-fat diet evaluating the expressions of 84 apoptosis related genes by real-time PCR array. First, we showed that the diet protocol herein employed was capable of inducing the activation of markers of inflammation and resistance to leptin and insulin anorexigenic activity in the hypothalamus, as previously demonstrated in other studies [3,5].

The effect of the diet upon the expressions of pro- and anti-apoptotic genes was remarkable. The modulation of 57% of the targets, including proteins involved in both pro- and anti-apoptotic activity, suggests that the fat-rich diet indeed has a damaging effect. As observed in other experimental settings, we suspect that the activation of some anti-apoptotic proteins provides a transient protection against the harmful effects of the diet [21,22]. However, as shown by distinct methods, ranging from TUNEL to transmission electron microscopy, in spite of the presence of anti-apoptotic activity, apoptosis was significantly increased in the hypothalamus of the HF rats. This was an anatomical- and cell-specific phenomenon since it was detected predominantly in the hypothalamus and affected mostly neurons.

Interestingly, in Wistar rats, which develop a certain degree of obesity and do not become diabetic, the diet produced a similar reduction in the expressions of orexigenic and anorexigenic neurotransmitters, suggesting that apoptosis was evenly distributed among neuronal sub-populations. However, in Swiss mice, which are genetically related to the diabetes prone AKR mouse [23] and, likewise, display an outstanding propensity to obesity and diabetes [24,25], the level of POMC was significantly reduced as compared to control, suggesting that this subpopulation of neurons was predominantly targeted. Although we have no current mechanistic explanation for this phenomenon, we suspect that, by targeting different subpopulations of neurons, diet-induced hypothalamic apoptosis leads to an imbalance in orexigenic *vs.* anorexigenic neurons in Swiss mice, but not in Wistar rats, therefore favoring body mass gain only in the mice. Two recent studies have provided strong evidence to suggest that changes in the numbers of certain types of hypothalamic neurons may have an impact on the control of body adiposity. First, Ryu and colleagues [10] reported that arcuate nucleus neurodegeneration caused by the depletion of Ubb, a protein involved in the production of ubiquitin, can affect energy homeostasis and lead to obesity. In addition, Kokoeva and coworkers [11] showed that hypothalamic neurogenesis induced by CNTF explains much of the sustained weight-reducing effect of this protein, a phenomenon that can be avoided by the use of an anti-mitotic agent. Therefore, we believe that, depending on genetic background and on different environmental factors, changes in neurogenesis and survival rates of hypothalamic neurons can have an impact on body adiposity.

Similarly to the effect of high-fat diets on body mass gain, here we show that activating apoptotic proteins in the hypothalamus is a property of the diet composition and not of the caloric intake.

Caloric pair-feeding retained most of the pro-apoptotic activity of *ad libitum* feeding.

Recent data from ours and other groups have shown that inflammatory signaling through TLR4 plays an important role in diet-induced insulin resistance and diabetes [26,27]. TLRs are highly-conserved members of the interleukin-1 receptor superfamily that respond to microbial signature motifs, leading to the activation of innate immune responses [28]. Some members of the TLR family are known to recognize lipid-containing motifs, such as lipopolysaccharides (LPS), which are ligands for TLR4. Whenever active, signal transduction through TLR4 leads to the coordinated induction of cytokine and other immune related genes expression [28,29].

When we tested the hypothesis that TLR4 could mediate some of the pro-apoptotic effects of the HF diet, we obtained data that, surprisingly suggested that the presence of this receptor may be protective, rather than harmful, for cells.

Although at first sight this data may seem unexpected, recent studies have provided evidence for a protective role for TLRs in the central nervous system [30]. In many conditions, TLRs are known to mediate detrimental signals, favoring the progression of inflammatory diseases of the brain. However, an appropriately-controlled TLR activity is also important for preserving the structure and function of neural tissues exposed to harmful conditions [30]. In two previous studies the loss of TLR4 function protected against inflammation and insulin or leptin resistance [26,27], however, on a long run, at least one study reported that in the absence of TLR4 signaling, body adiposity would increase upon high-fat diet consumption [27]. Thus, it is likely that, in diet-induced inflammation of the hypothalamus, TLR4 exerts a dual function, on one side activating pro-inflammatory pathways that play a central role in the development of resistance to leptin and insulin, and on the other side restraining further damage by controlling the apoptotic activity.

As an outcome of the present study, it will be important to investigate the proposed dual role for TLR4 in the hypothalamus, participating in the balance between inflammation and cell survival. In addition, as recent studies have shown that insulin and leptin resistance in extra-hypothalamic brain regions may relate to neurological disorders, such as Alzheimer's disease and depression [31,32], it will be exiting to evaluate the participation of TLRs and high-fat feeding in these contexts.

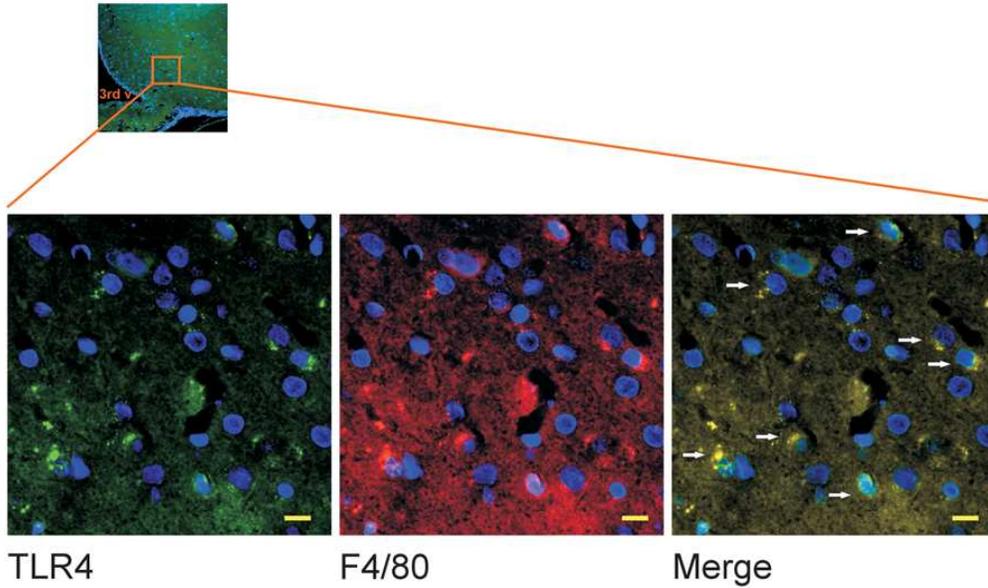
Acknowledgments

We thank Dr. N. Conran for English grammar review.

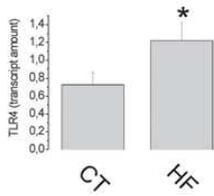
Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LAV. Performed the experiments: JCM AC JM DEC EAR JRP ALO. Analyzed the data: TR JBC ALO MAS LAV. Contributed reagents/materials/analysis tools: LAV. Wrote the paper: ALO MAS LAV.

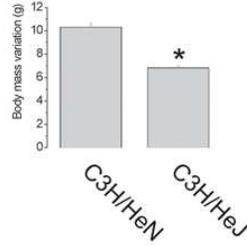
A.



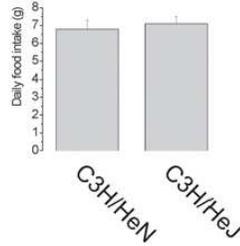
B.



C.



D.



E.

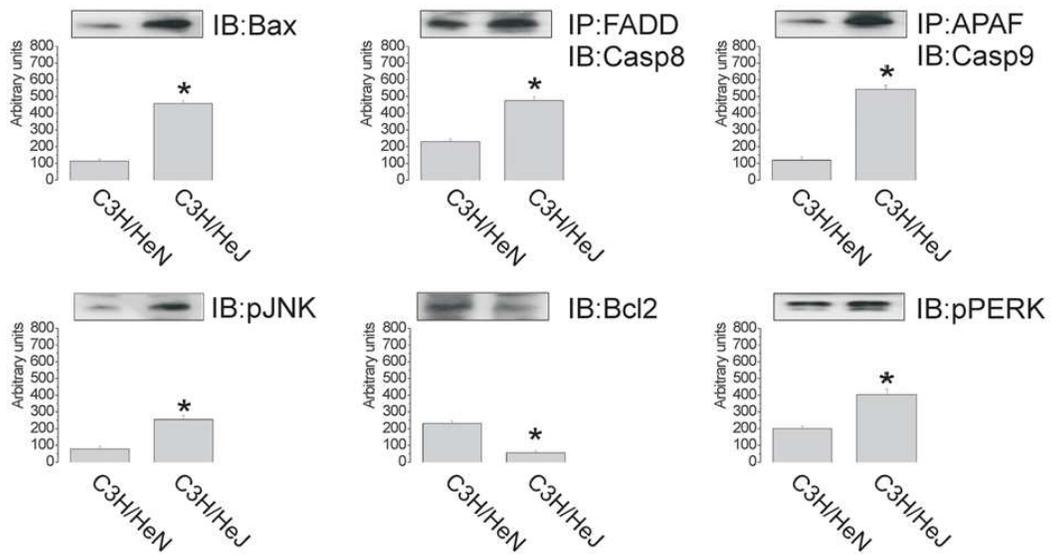


Figure 6. TLR4 protects against diet-induced apoptosis of hypothalamic neurons. (A) Representative TLR4 (rhodamine) and F4/80 (fluorescein) double immunofluorescence staining of samples from hypothalamus of Wistar rats; arrows in merge depict double positive cells; inset depicts approximate site in the arcuate nucleus that was evaluated in detail. (B) Real-time PCR analysis of TLR4 transcript amount in samples obtained from the hypothalamus of Wistar rats fed on control (CT) or high-fat (HF) diets. (C) Body mass variation (g) of C3H/HeN and C3H/HeJ mice fed on HF diet for 8 w. (D) Mean daily food intake (g) of C3H/HeN and C3H/HeJ mice fed on HF diet. (E) Immunoblots (IB) of hypothalamic protein extracts obtained from C3H/HeN and C3H/HeJ mice fed on HF diet; in some cases samples were submitted to immunoprecipitation (IP) prior to IB. In all experiments $n = 5$. In A, inset magnification, $\times 20$ and captions magnification, $\times 400$ (scale bar, 10 μm), nuclei are stained in blue by DAPI; 3rd v, third ventricle. B, * $p < 0.05$ vs. CT; in C and E, * $p < 0.05$ vs. C3H/HeN. doi:10.1371/journal.pone.0005045.g006

References

- Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116: 337–350.
- Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, et al. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29: 359–370.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, et al. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146: 4192–4199.
- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C (2004) Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145: 4880–4889.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, et al. (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 10: 734–738.
- Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, et al. (2006) Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 12: 917–924.
- Siegel RM, Muppidi J, Roberts M, Porter M, Wu Z (2003) Death receptor signaling and autoimmunity. *Immunol Res* 27: 499–512.
- Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM (2004) Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 21: 461–465.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, et al. (2005) Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2: S97–107.
- Ryu KY, Garza JC, Lu XY, Barsh GS, Kopito RR (2008) Hypothalamic neurodegeneration and adult-onset obesity in mice lacking the *Ubb* polyubiquitin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4016–4021.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310: 679–683.
- Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho GR, et al. (2001) Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500: 119–124.
- Paxinos G, Watson CR, Emson PC (1980) AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3: 129–149.
- Bertelli DF, Araujo EP, Cesquini M, Stoppa GR, Gasparotto-Contessotto M, et al. (2006) Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositol trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 147: 5385–5399.
- Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TL, et al. (2004) Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J Endocrinol* 181: 25–38.
- Astrup A, Dyerberg J, Sellick M, Stender S (2008) Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev* 9 Suppl 1: 48–52.
- Wade GN (1982) Obesity without overeating in golden hamsters. *Physiol Behav* 29: 701–707.
- Picardi PK, Calegari VC, Prada Pde O, Moraes JC, Araujo E, et al. (2008) Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 149: 3870–3880.
- Xue B, Kim YB, Lee A, Toschi E, Bonner-Weir S, et al. (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance. *J Biol Chem* 282: 23829–23840.
- Degasperi GR, Romanatto T, Denis RG, Araujo EP, Moraes JC, et al. (2008) UCP2 protects hypothalamic cells from TNF-alpha-induced damage. *FEBS Lett* 582: 3103–3110.
- Lu Y, Fukuyama S, Yoshida R, Kobayashi T, Saeki K, et al. (2006) Loss of *Socs3* gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem* 281: 36683–36690.
- Leber B, Lin J, Andrews DW (2007) Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* 12: 897–911.
- West DB, Goudey-Lefevre J, York B, Truett GE (1994) Dietary obesity linked to genetic loci on chromosomes 9 and 15 in a polygenic mouse model. *J Clin Invest* 94: 1410–1416.
- De Souza CT, Araujo EP, Stoppiglia LF, Pauli JR, Ropelle E, et al. (2007) Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB J* 21: 1153–1163.
- De Souza CT, Araujo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, et al. (2005) Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 48: 1860–1871.
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, et al. (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986–1998.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, et al. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015–3025.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, et al. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777–1782.
- Hanisch UK, Johnson TV, Kipnis J (2008) Toll-like receptors: roles in neuroprotection? *Trends Neurosci* 31: 176–182.
- Pasineti GM, Eberstein JA (2008) Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 106: 1503–1514.
- Rintamaki R, Grimaldi S, Englund A, Haukka J, Partonen T, et al. (2008) Seasonal changes in mood and behavior are linked to metabolic syndrome. *PLoS ONE* 3: e1482.

4. ANEXOS

Seguem abaixo experimentos realizados no decorrer do desenvolvimento dessa tese e que, apesar de não terem sido incluídos no artigo, contribuíram para nossa compreensão do fenômeno como um todo.

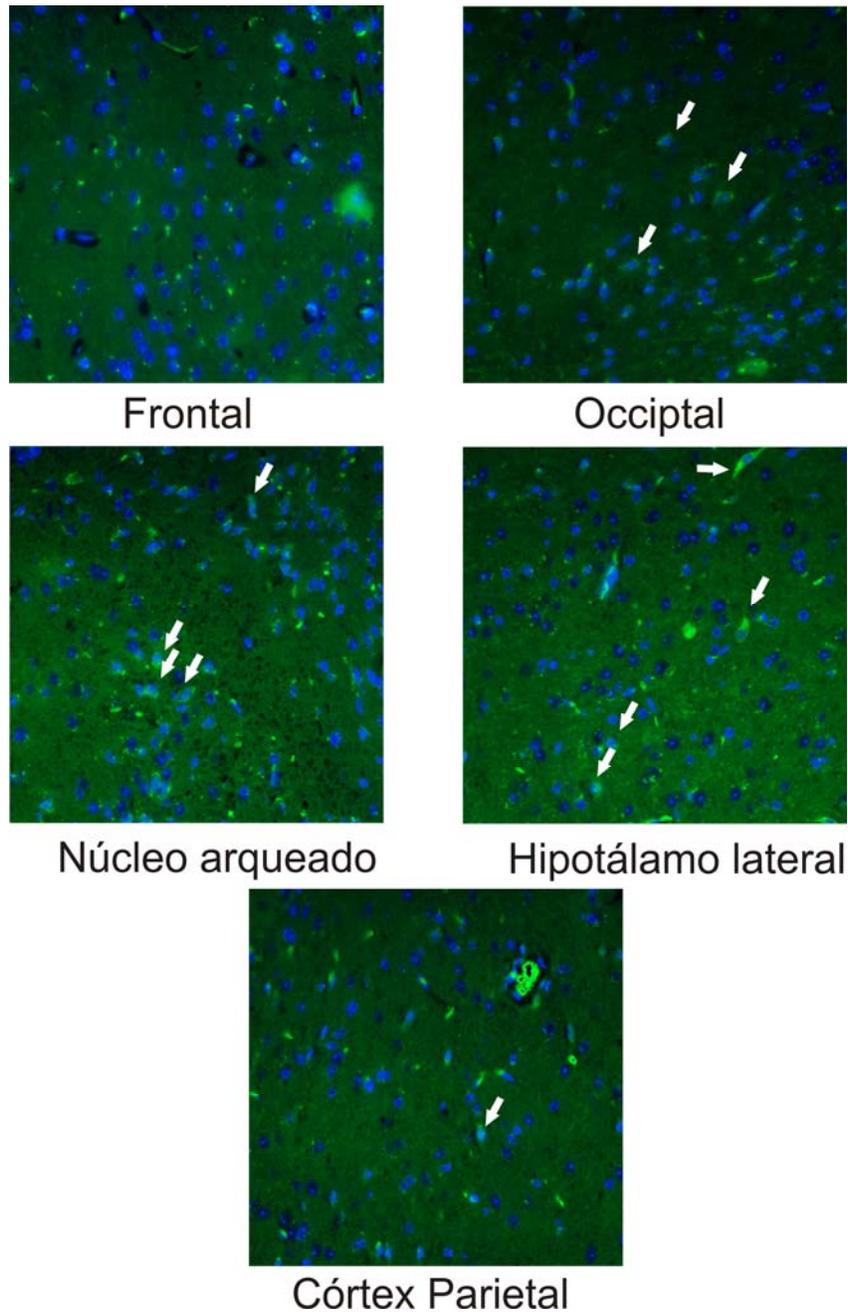


Figura 1 de anexos. Ação da dieta hiperlipídica na expressão da proteína pró-apoptótica Bax em outras regiões cerebrais avaliado por imunofluorescência. Hipotálamos fixados de ratos tratados com dieta hiperlipídica por 16 semanas foram submetidos à marcação por imunofluorescência com anticorpo anti-Bax. Células positivamente marcadas são indicadas por setas. Por meio desse experimento observamos que o efeito pró-apoptótico da dieta ocorre predominantemente no hipotálamo. Raras células marcadas foram visualizadas em outras regiões. Aumento 400x.

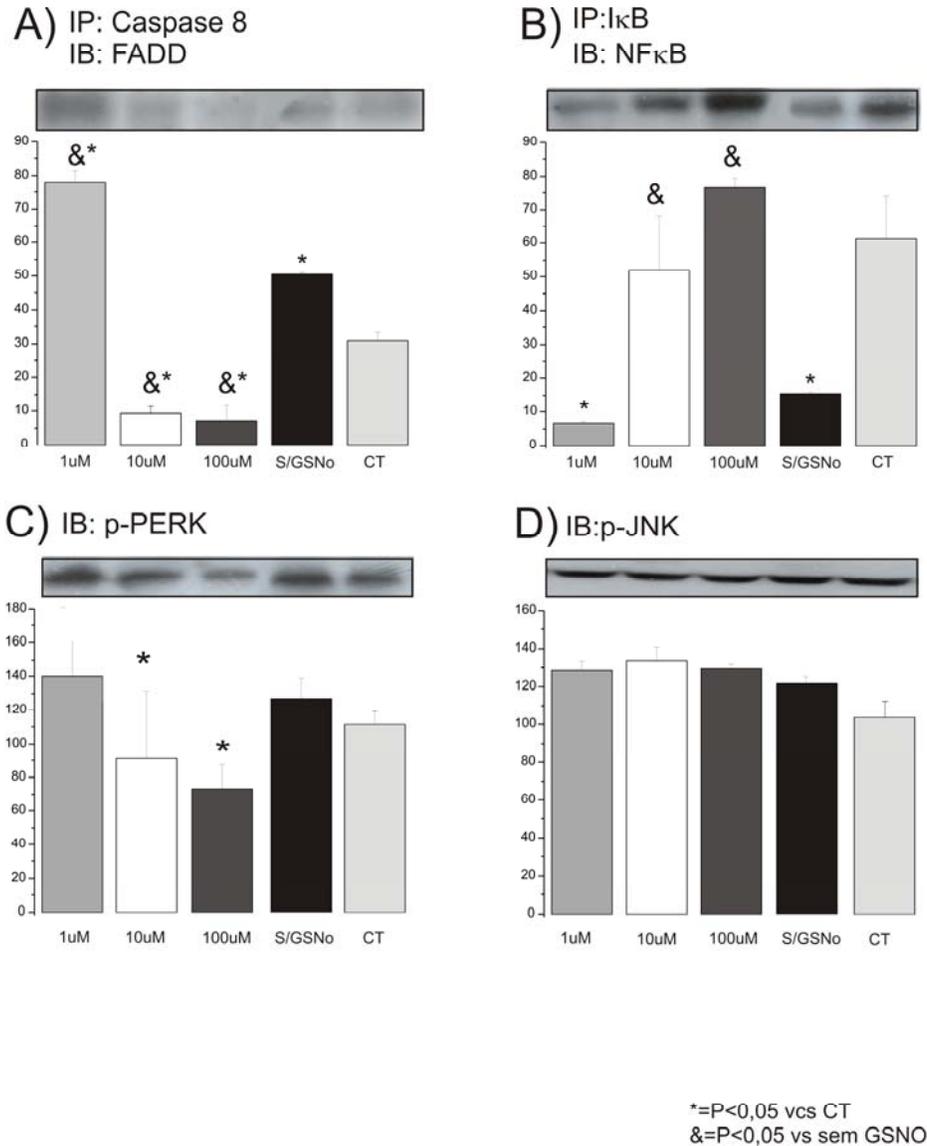


Figura 2 de anexos. Ação do doador de óxido nítrico GSNo sob a expressão de proteínas pró-apoptóticas, inflamatórias e de estresse de retículo endoplasmático. Ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas foram tratados icv com GSNo nas concentrações de 1, 10 e 100 uM por 1 semana, 2 vezes ao dia. Com tais experimentos tentamos explorar uma das possíveis vias envolvidas na indução/proteção de apoptose de neurônios do hipotálamo. Como obtivemos resultados mais consistentes ao avaliar a via TLR4, a via de sinalização de NO acabou sendo temporariamente abandonada.

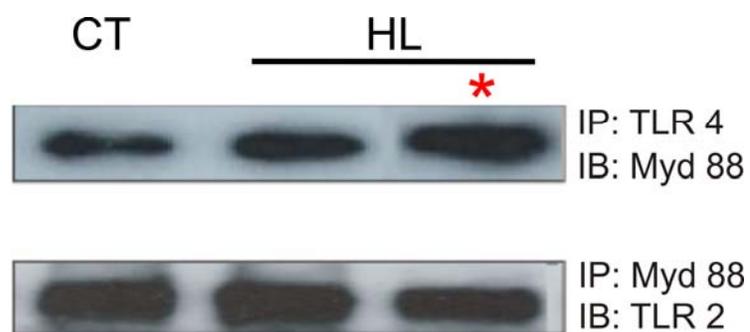
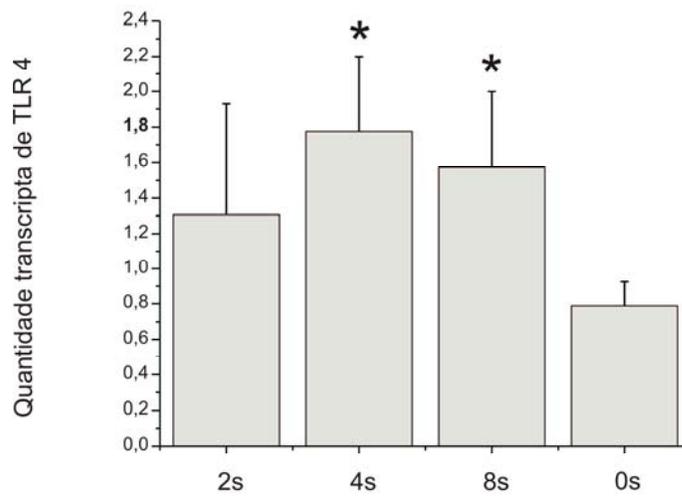
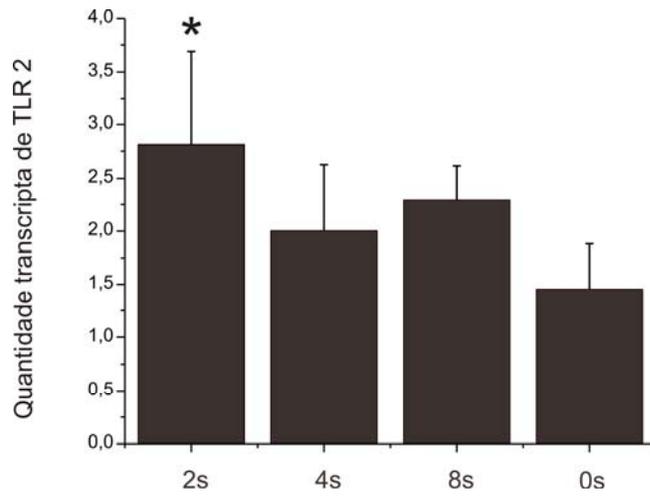


Figura 3 de anexos. Expressão das proteínas TLR 4 e 2 em animais tratados com dieta (HL) ou não (CT), *p<0,05. Hipotálamos de animais tratados com dieta por 8 e 16 semanas (primeira e segunda banda respectivamente, destacadas por HL-hiperlipídica) e controles, sem dieta (CT). Ao abordarmos a via TLR investigamos inicialmente ambos TLR2 e TLR4, receptores que atuam como sensores de patogenicidade induzida por lípidos. Como observamos ativação preferencial de TLR4 (blot superior dessa figura), optamos por explorar apenas essa via.



*= $P < 0,05$ vs 0s

Figura 4 de anexos. Avaliação por RT-PCR dos níveis de RNAm para TLR 2 e TLR 4 em hipotálamo de ratos. Hipotálamos de Ratos Wistar tratados com dieta hiperlipídica por 2, 4, 8 ou 0 semanas (controle-ração padrão) foram extraídos para realização do *real-time PCR* afim de quantificar os níveis de RNAm dos receptores *toll-like*.

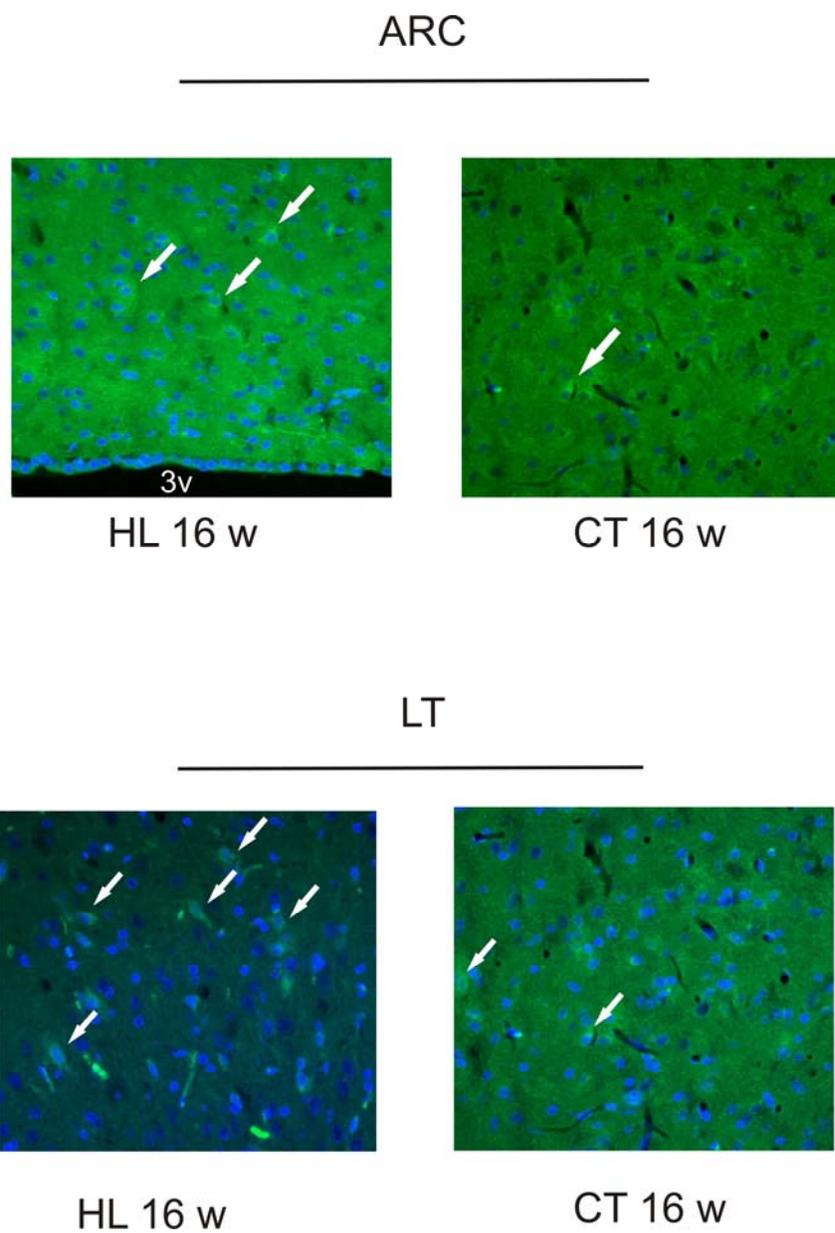


Figura 5 de anexos. Imunofluorescência com anexina V. Hipotálamos de Ratos Wistar (ARC-núcleo arqueado e LH-hipotálamo lateral) tratados com dieta hiperlipídica (HL) por 8 semanas (CT-ração padrão) foram extraídos para realização de marcação com anexina V FITC +DAPI. As setas indicam exemplos da marcação do anticorpo à fosfatidilserina externalizada, característica de apoptose.

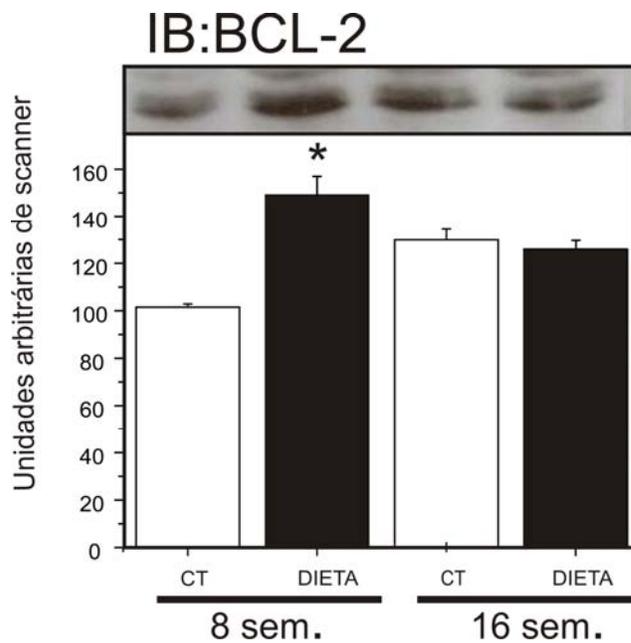


Figura 6 de anexos. Análise por Western Blot da proteína anti-apoptótica Bcl-2 *p<0,05. Hipotálamos de ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica por 8 e 16 semanas foram submetidos a preparos em tampão específico para realização de extrato total protéico para detecção da expressão da proteína Bcl-2, a qual aumenta após 8 semanas de dieta, mas não foi suficiente para impedir o curso da apoptose.

5. CAPÍTULO 2-DISCUSSÃO GERAL

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. A necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando existe um colapso na homeostasia celular, sempre que a célula sofre variações extremas de suas condições fisiológicas. Ocorre então lise da membrana celular e conseqüente libertação de componentes intracelulares para o exterior (Trump, Berezsky et al. 1997). Já a apoptose é um mecanismo de morte celular que exerce importante função tanto no desenvolvimento quanto na homeostase de tecidos, e tem como objetivo remover células infectadas, danificadas ou transformadas, pela ativação de um programa de autodestruição celular intrínseco controlado (Lawen 2003).

A apoptose é a morte celular programada, na qual as células apresentam alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas tais como a formação de vesículas membranosas, a troca de lado de fosfatidilserina da membrana plasmática, a fragmentação nuclear e a ativação funcional das caspases, uma família de proteases cisteína.

Como parte da investigação inicial da eventual presença e dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos com a indução de apoptose no hipotálamo dos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica, avaliamos a presença de proteínas pró- e anti-apoptóticas no hipotálamo os ratos alimentados com dieta por 0, 8 e 16 semanas. Partimos do princípio que a ativação bioquímica da apoptose pode ocorrer por dois caminhos: a via intrínseca, que envolve a liberação mitocondrial do citocromo c, e de fatores pró-apoptóticos associados com a ativação da caspase 9; e a via extrínseca, originado a partir de ligações de fatores biológicos nos receptores de morte presentes na superfície da membrana plasmática como Fas, resultando na ativação da caspase 8 e 10. A partir da via extrínseca, o balanço entre membros pró-apoptóticos (Bax, Bid, Bad) e anti-apoptóticos (Bcl-x1, Bcl-2) da família Bcl-2 é comprometido. Esse balanço é representado pela proporção dos

homodímeros pró-apoptóticos que se formam na membrana externa da mitocôndria. Esses homodímeros (de moléculas como Bak, Bax) são requeridos para tornar a membrana mitocondrial permeável para a liberação de ativadores de caspases, como o citocromo c (Murphy, Ranganathan et al. 2000). Uma vez liberado o citocromo c se liga à Apaf-1 e ATP, que por sua vez se liga à pró-caspase 9, criando um complexo protéico chamado apoptossomo. Este cliva a pró-caspase 9, levando à sua forma ativa, que por sua vez, ativa a caspase efetora 3. Já a caspase 8, ativada por Fas e seu complexo de morte FADD, ativa outros membros da família caspase e leva à execução da apoptose (Wajant 2002), em alguns tipos de células. Além disso, em alguns outros tipos, Fas+FADD aumentam a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria e amplificam a ativação da caspase 8.

Assim, por western blotting, imunofluorescência em cortes histológicos do hipotálamo [com marcação de proteínas pró-apoptóticas, neuromedina N, anexina V (Koopman, Reutelingsperger et al. 1994), sinaptofisina, TUNEL (Gavrieli, Sherman et al. 1992)] análise de PARP-1 (Chiarugi and Moskowitz 2002), microscopia eletrônica de transmissão e array em RT-PCR obtivemos resultados animadores, pois através de diferentes métodos, tanto quantitativos quanto qualitativos, observamos que, de fato, a oferta de uma dieta rica em lípides altera a integridade de neurônios hipotalâmicos, induzindo-os ao processo apoptótico. Notamos diferenças interessantes quanto à expressão das proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, revelando possíveis regulações, ainda desconhecidas, no balanço sobrevivência/apoptose diante de uma dieta rica em gordura por tempos diferentes.

De acordo com dados pregressos da literatura, durante o desenvolvimento da obesidade observa-se a ativação de vias de estresse celular e vias inflamatórias (Uysal, Wiesbrock et al. 1997; Yuan, Konstantopoulos et al. 2001; Hirosumi, Tuncman et al. 2002).

Contudo, a origem e a conexão entre esses sinais não é conhecida. Um participante em potencial na resposta ao estresse celular é o retículo endoplasmático (RE), a organela responsável pela síntese de novas proteínas. Tais proteínas devem ser propriamente moldadas e modificadas após a tradução, antes de saírem do RE. A moldagem correta de proteínas e sua modificação requer o trabalho de proteínas chaperonas assim como de um microambiente adequado no RE. Quando as condições luminais do RE são alteradas ou a capacidade das chaperonas está comprometido, a célula ativa cascatas de sinalização que funcionam para controlar as condições impróprias e restaurar um ambiente de síntese protéica favorável. Tais alterações são referidas como estresse de retículo endoplasmático (RE) e a resposta ativada é a resposta à proteína não-moldada (*unfolded protein response*-UPR). Quando a UPR é perturbada ou não é suficiente para modificar as condições estressantes, a morte celular por apoptose é induzida (Hampton 2000; Mori 2000; Harding, Calton et al. 2002). A UPR consiste de três vias de sinalização maiores, iniciadas por sensores de estresse localizados no RE; um deles é a cinase PKR-like, ou PERK. Essas vias de sinalização ativam fatores de transcrição que irão atuar na indução de uma variedade de genes de resposta ao estresse de RE.

A PERK fosforila a subunidade α do fator iniciador de tradução 2 (eIF2 α) em resposta ao estresse do RE. Quando fosforilado, eIF2 α é incapaz de iniciar de forma eficiente a tradução, levando à inibição global da síntese protéica. Logo, o *status* de fosforilação de PERK e de eIF2 α é um indicador-chave da presença de estresse de RE. Todas as vias de UPR contribuem para a indução de apoptose, quando as mudanças protetoras mediadas por UPR falham em restaurar a capacidade de montagem. Fatores de

transcrição específicos, a c-Jun NH₂ terminal kinase (JNK) e caspases são implicados como mediadores de sinais apoptóticos em resposta aos estresse de RE.

As condições que iniciam o estresse de RE são a privação de glicose ou nutrientes, infecções virais, lipídeos, aumento da síntese de proteínas secretoras e expressão de proteínas não-moldadas ou mutantes (Ma and Hendershot 2001; Kaufman, Scheuner et al. 2002; Kharroubi, Ladriere et al. 2004). Muitas destas condições ocorrem durante a obesidade. Além disso, a obesidade aumenta a demanda da maquinaria de síntese protéica das células; também está associada com estresse mecânico, acúmulo excessivo de lipídeos, anormalidades em fluxos de energia intracelulares e disponibilidade de nutrientes. Devido a estes fatos, autores postularam que a obesidade deve ser um estímulo crônico para o desenvolvimento do estresse de RE, podendo estar envolvido ainda com desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Ozcan, Cao et al. 2004). Dessa forma, decidimos investigar proteínas envolvidas em estresse de retículo por western blotting. Observamos aumento da forma ativada de PERK, a p-PERK e a inativada p-EIF-2 α nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, principalmente após 16 semanas de dieta. Desta forma, podemos concluir que há ativação de estresse de RE em hipotálamo de animais tratados com dieta rica em lípidos, mas a modulação da apoptose por esta via deve ocorrer apenas após este período.

A função dos ácidos graxos como moléculas sinalizadoras que regulam a expressão de genes relacionados a vias metabólicas ou doenças inflamatórias é bem conhecida: interferem na função fisiológica celular, como proliferação, apoptose, diferenciação, metabolismo (Lee and Hwang 2006). Diante das múltiplas evidências da indução de apoptose pelo consumo de dieta hiperlipídica, decidimos avaliar se um receptor que atua

como sensor de determinantes patogênicos lipídicos pudesse atuar como mediador do sinal inflamatório/apoptótico no hipotálamo. As proteínas *toll*, identificados em *Drosophila sp*, foram primeiro reconhecidos como tendo papel no desenvolvimento característico dorsal-ventral dos embriões. A seguir, revelou-se que tais proteínas participam na indução da resposta imune por produção do peptídeo antifúngico, a drosomicina, em *Drosophila sp* adulta. Os *toll like-receptors* (TLRs) são os homólogos mamíferos dos *toll* (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Até o momento, onze TLRs foram identificados em humanos enquanto que treze podem ser encontrados no genoma de ratos. Os TLRs reconhecem PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) de organismos invasores, sendo caracterizados por lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e várias proteínas (Aderem and Ulevitch 2000; Akira, Takeda et al. 2001). Cada TLR reconhece diferentes PAMPs, como por exemplo um agonista para o TLR4 é o lipopolissacarídeo bacteriano; enquanto lipopeptídeos bacterianos e peptídeoglicanos são ligantes para o TLR2 (Aderem and Ulevitch 2000; Medzhitov and Janeway 2000). Sabe-se hoje que os TLRs possuem papel crítico em ativar e regular respostas imunes adaptativas e inatas que ao final levam à eliminação de patógenos invasores em mamíferos. A resposta imune inata via TLRs ativadas é acompanhada da expressão de proteínas inflamatórias. Entretanto, evidências recentes sugerem que moléculas não microbianas também podem ativar TLRs. Agonistas TLRs endógenos liberados do próprio organismo devem causar respostas inflamatórias estéreis e simultaneamente respostas imunes desnecessárias. Quando estes TLRs são estimulados por quaisquer agonistas, são recrutadas moléculas adaptadoras para ativar vias de sinalização distais aos receptores. Quatro adaptadores principais foram descobertos até o momento, como por exemplo, o Myd88, ativado pelas vias TLR2 e 4. Após sua ativação, há o início de uma ampla cascata de sinalização, via várias interações e reações de fosforilação com

outros adaptadores *downstream* que culminam na ativação de complexos canônicos como IKK $\alpha/\beta/\gamma$ resultando na ativação do fator de transcrição NF κ B. Também pode ocorrer a ativação das kinases JNK e p38. Como resultado, genes alvo inflamatórios como COX-2 e citocinas são expressos (Muzio, Natoli et al. 1998). Há ainda relatos de que ácidos graxos saturados induzem a ativação de vias de sinalização dependentes de Myd88 através da ativação dos receptores TLR2 e 4. Quanto aos ácidos graxos insaturados, a mesma ativação não é observada, de tal forma que o DHA (*docosahexaenoic acid*) inibe a ativação de NF κ B e COX induzida por vários agonistas TLR, como lipopeptídeos (Lee, Sohn et al. 2001). Com base nestas informações, decidimos estudar se ocorreria a ativação dos receptores *toll-like*, especificamente o TLR2 e 4 (Fig.3-ANEXOS). Inicialmente observamos que a dieta hiperlipídica foi incapaz de promover ativação de TLR2, porém, a mesma dieta foi capaz de induzir a sinalização através de TLR4.

Diante dos resultados de aumento de ativação da via TLR4, avaliamos a expressão de proteínas envolvidas na via apoptótica, inflamatória e de estresse de retículo endoplasmático em animais com ausência total da sinalização através desse receptor (C3H/HeJ), afim de confirmar a participação deste receptor no processo de morte celular induzido pela dieta. Os resultados foram de fato surpreendentes, pois, a princípio, não esperávamos observar aumento de atividade apoptótica em animais com ausência de sinalização TLR4; no entanto, embora não tenhamos visto aumento significativo na via da caspase 8, observamos aumento na via caspase 9 e Bax, com aumento de fosforilação da proteína JNK.

Em publicação recente, Block, M. e colaboradores (Block, Zecca et al. 2007) mostram que a micróglia monitora o microambiente do SNC, protegendo os neurônios dos

mais diversos tipos de danos, sendo este conjunto de células equipado com diversos receptores e outras moléculas de membrana, incluindo o TLR4. Diante de nossos resultados, acreditamos que o dano gerado pelo consumo de ácidos graxos causa um certo grau de apoptose que, de início, é mediado por TLR4. Mas ao mesmo tempo, existe uma função dupla deste receptor frente à inflamação hipotalâmica diante da obesidade induzida por dieta: ativa vias pró-inflamatórias que têm grande papel no desenvolvimento da resistência de leptina e insulina, e por outro lado, reprime maiores danos por controle da atividade apoptótica gerada. Trabalhos ainda mostram que, quando o estímulo maléfico persiste, há um *feedback* de limitação própria de sinalização do receptor (Hanisch, Johnson et al. 2008) deixando de levar à produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias e apoptóticas e levando a apenas um sinal inflamatório discreto. Logo, em animais que possuem a via TLR4, a gordura gera na micróglia um sinal inflamatório protetor com o tempo, que não impede a apoptose, mas esta não ocorre de forma exacerbada. Quando TLR4 está ausente, no caso dos animais C3H/HeJ, a micróglia não recebe a informação adequada e deixa de gerar o sinal protetor ao neurônio, piorando por exemplo a via da caspase 9. Assim, o TLR4 pode agir como fator de proteção (sinal inflamatório brando) ou apoptótico.

Com o objetivo de consolidar essas informações a respeito da micróglia e TLR4, realizamos imunofluorescência de marcação dupla em cortes histológicos hipotalâmicos de ratos alimentados com dieta para verificar se o receptor TLR4 estaria presente na micróglia e se esta estaria ativada (proteína F4/80) (Fig. 6A-capítulo 1). Verificamos que o TLR4 é de fato expresso em células da micróglia em animais tratados com dieta (não verificamos aumento da marcação de TLR4 nos controles), sugerindo então que esta população celular

desempenha função importante, através de aumento de seus receptores TLR4, nos processos gerados pela oferta de dieta rica em gordura.

Para avaliar quanto tempo após o início da alimentação com dieta hiperlipídica há indução da de TLRs, realizamos RT-PCR para TLR2 e TLR4 de hipotálamos de ratos Wistar tratados com dieta por 2, 4 e 8 semanas. Observamos que há um aumento no RNAm para TLR2 com 2 semanas de dieta, não persistindo após 4 e 8 semanas (Fig.4-ANEXOS). Quanto ao receptor TLR4, seu RNAm se eleva após 4 semanas de dieta, continuando pelo menos até 8 semanas (Fig.4-ANEXOS), o que nos leva a crer mais uma vez que o processo inflamatório hipotalâmico que ocorre em ratos por volta de um mês após a oferta de uma dieta rica em lípidos é mediado, pelo menos em parte, por receptor TLR4 e que este está envolvido no processo apoptótico.

Investigamos ainda a possível presença de apoptose em outras regiões do cérebro de animais tratados com dieta hiperlipídica, além do hipotálamo (Fig 1-ANEXOS). Para tal, obtivemos cortes da região occipital, frontal, córtex parietal e também hipotálamo de animais alimentados com dieta entre 8 e 16 semanas. Então, realizamos imunohistoquímica com marcação da proteína Bax, a qual teve sua presença significativamente induzida em todos os experimentos com hipotálamo. A presença da marcação desta proteína apoptótica se confirmou mais uma vez em hipotálamo e um pouco na região occipital, mas não ocorreu nas outras regiões mencionadas, revelando que a região hipotalâmica de alguma maneira é mais susceptível ao estímulo apoptótico iniciado pela dieta.

A fim de responder se a apoptose observada é causada pela gordura em si ou pela quantidade ingerida da mesma, realizamos alguns blots com as principais proteínas das vias apoptóticas e também de estresse de RE, de acordo com protocolo descrito em Materiais e Métodos (item Animais/pareamento por calorías). Observamos presença de da via

apoptótica extrínseca, via inflamatória e de estresse de RE. Esses resultados estão de acordo com o padrão de expressão protéica em animais que ingerem dieta hiperlipídica “*ad libitum*”, levando-nos a crer que mesmo em quantidades menores, mas diárias, a gordura leva à apoptose em neurônios hipotalâmicos.

Realizamos também a análise comparativa da expressão gênica utilizando a técnica do cDNA *macroarray*, que nos possibilitou investigar simultaneamente 84 genes pró- e anti-apoptóticos que poderiam ser modulados de alguma forma pela dieta hiperlipídica por 8 semanas (Tabela 2 e 3-Capítulo 1). Na Tabela 2, observa-se os RNAm das proteínas pró-apoptóticas que de alguma forma foram reguladas pela ingestão da dieta. Observamos uma certa redução em algumas proteínas de via intrínseca, mas a caspase 8, classicamente ativadora de via extrínseca apoptótica, apresentou um aumento em mais de 300 vezes, assim como outras caspases. Na Tabela 3 (capítulo 1) estão os RNAm anti-apoptóticos modulados, onde observamos também um certo aumento na sua modulação, revelando a aparente existência de processos de controle da apoptose. Portanto, acreditamos que há predomínio de ativação da resposta apoptótica pela via extrínseca após 8 semanas de dieta, a qual ocorre via receptores de morte sendo alguns potenciais ligantes o TNF α , de acordo com trabalho realizado pelo nosso grupo (De Souza *et al*, 2005), sendo que a caspase 9, outrora vista como aumentada, teve uma discreta modulação positiva. Mas uma modulação adicional, após 16 semanas, também deve ocorrer, tendo em vista a ativação de estresse de RE [autores mostram que o estresse de RE leva à ativação da via intrínseca apoptótica (mitocondrial);(Reimertz, Kogel et al. 2003)].

Uma vez caracterizado o fenômeno, alguns receptores e algumas vias envolvidas, partimos então para a investigação de quais sub-populações neuronais hipotalâmicas

estariam sendo preferencialmente acometidas por apoptose. Verificamos em hipotálamo de ratos Wistar tratados com dieta o igual acometimento por apoptose tanto em neurônios anorexigênicos quanto orexigênicos (Fig.5A-capítulo 1). Nos controles, não detectamos caspase 3 (não mostrado) o que também se confirmou por RT-PCR (Fig.5, B e C-capítulo 1). Esse fato nos levou a crer que a ausência de diferença na morte celular tanto em neurônios orexigênicos quanto nos anorexigênicos poderia se dever ao fato de que ratos Wistar não possuem grande predisposição genética para obesidade induzida por dieta e que estes ganham peso em menor proporção que animais geneticamente susceptíveis à obesidade. Logo, decidimos investigar os mesmos parâmetros em uma linhagem de animais geneticamente predispostos à obesidade induzida por dieta, o camundongo Swiss. Nestes, observamos redução evidente na expressão de POMC, mas não de NPY (Fig.5-D-E/Capítulo 1), o que nos mostrou que o *background* genético é um fator extremamente importante para a sobrevivência/morte de neurônios hipotalâmicos e na adiposidade corpórea.

Diante de todos nossos resultados, tornou-se evidente a necessidade de verificar a possibilidade de bloquear o processo apoptótico. Muitas linhas de pesquisa apontam a manipulação de algumas proteínas envolvidas no processo apoptótico, como as caspases (Lavrik, Golks et al. 2005), IKK/NFκB (Luo, Kamata et al. 2005), membros da família Bcl-2 (Letai 2005), indução de heat-shock proteins (Beere 2005) e Akt (Amaravadi and Thompson 2005) como tentativa de tratamento de diversas doenças, incluindo as ocasionadas por excesso de apoptose, como as neurodegenerativas ou por ausência do processo, como câncer. Hoje já existem inibidores farmacológicos de apoptose já

aprovados pelo FDA ou ainda em fase de desenvolvimento clínico (Green and Kroemer 2005).

Um mecanismo que vem sendo bastante estudado como possível bloqueador do processo apoptótico é o óxido nítrico (NO). O NO exerce a maioria dos efeitos fisiológicos por ligação ao grupo heme de receptores acoplados à guanilil ciclase (GC). Essa ligação resulta em mudanças conformacionais que levam à atividade GC e então geração de GMP-cíclico (GMPc) a partir do GTP, o que leva à ativação de vários alvos *downstream*, incluindo proteíno-quinases, fosfodiesterases e canais iônicos levando à modificações na função celular, como relaxamento de fibras musculares, desagregação plaquetária e plasticidade sináptica (Blaise, Gauvin et al. 2005). Além disso, o GMPc leva à ativação de outras proteíno-quinases dependentes de GMPc e a supressão da atividade das caspases (Dash, Cartwright et al. 2003). A literatura ainda mostra que altas doses de NO são inibidoras de apoptose via mecanismos dependentes e independentes de GMPc (Dash, Cartwright et al. 2003). Quando o NO está presente em concentrações suficientes para ativar GC solúvel, a apoptose é inibida pela via da PI3k/Akt dependente de proteíno quinase G, resultando em fosforilação de Bad e supressão subsequente da liberação do citocromo c e ativação de caspase 3 (Ha, Kim et al. 2003). No entanto, o papel do NO na apoptose é controverso. De fato, foi mostrado que este gás pode ter propriedades pró- e anti-apoptóticas. O mecanismo bioquímico que contorna os efeitos anti-apoptóticos mediados por NO devem depender do tipo celular com vias de sinalização múltiplas. Um deles é a inibição da apoptose pela via NO/GMPc, a qual previne o processo de morte em neurônios, por exemplo (Kim, Chung et al. 1999), a qual está relacionado com a produção do GMPc que, como citado anteriormente, culmina na inibição da atividade da caspase 3. Ainda, o NO pode proteger algumas células da apoptose induzida por diferentes tipos de

estímulo, como por TNF α (Kwon, Min et al. 2001), estresse oxidativo (Kim, Bergonia et al. 1995) e privação de glicose sérica (Kim, Chung et al. 1999).

Decidimos então tratar os animais alimentados com dieta hiperlipídica com um doador de NO, o GSNO, por via icv para verificar o comportamento de proteínas envolvidas no processo apoptótico, além de outras estudadas no projeto. Nossos resultados, apesar de incipientes, foram extremamente interessantes pois verificamos que doses mais altas do doador (10 e 100 μ M) diminuíram a via de ativação apoptótica extrínseca e diminuíram ao processo inflamatório (A e B, Fig 2; ANEXOS). A fosforilação e, portanto, ativação da proteína PERK envolvida no REs também diminui nestas dose, mostrando uma diminuição deste processo (C-Fig 2-ANEXOS). A proteína p-JNK, também envolvida no processo inflamatório não apresentou resultados significativos (D- Fig 2-Capítulo 2).

Nosso trabalho investigou os efeitos centrais gerados pela oferta de uma dieta rica em lípidos e mostrou que, além da já conhecida indução de uma resposta inflamatória, um efeito ainda mais deletério pode ocorrer: a apoptose de neurônios do hipotálamo, células com papel central na regulação do metabolismo energético. Mostramos como este processo pode se desenvolver e observamos que os receptores TLR4 têm papel extremamente importante no desenvolvimento e controle deste processo. Em trabalho recentemente desenvolvido em nosso laboratório (Milanski, Degasperi et al. 2009) observou-se que animais tratados por via icv com ácido araquídico, ácido graxo saturado de 20 carbonos comumente presente em dietas ricas em gordura, apresentaram ativação do receptor TLR4 e que tal via tem papel central na indução do fenômeno inflamatório no hipotálamo. Esses dados portanto, junto com outros previamente publicados (Lee, Sohn et al. 2001; Lee, Ye et al. 2003) revelam que muitos dos componentes lipídicos insaturados provenientes de dietas

ricas em gordura são os responsáveis por levar aos danos observados. No entanto, mecanismos para o bloqueio destes danos são possíveis: além do controle da ingestão de alimentos potencialmente pró-inflamatórios (ácidos graxos saturados), mostramos que doadores de NO podem ser possíveis armas no controle de danos já em desenvolvimento, podendo talvez, rever seu curso.

6. APÊNDICE

Materiais e Métodos

Materiais

Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, ditioneitol (DTT), paraformaldeído da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). A proteína A marcada com iodo radioativo (^{125}I) fornecida pela *Amersham* (Aylesbury, UK). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2 μm) de *Schleicher & Schuell*. Os anticorpos utilizados foram anti- SOCS3 (rabbit polyclonal, sc-9023), PARP (rabbit polyclonal, sc-7150), Bcl2 (rabbit polyclonal, sc-492), phospho-Bad (pBad) (goat polyclonal, sc-7999), Bax (rabbit polyclonal, sc-493), Apaf1 (goat polyclonal, sc-26685), caspase-9 (rabbit polyclonal, sc-7885), FADD (rabbit polyclonal, sc-5559), caspase-8/p20 (rabbit polyclonal, sc-7890), neuromedin-N (NeuN) (goat polyclonal, sc-7593), phospho-PERK (pPERK) (rabbit polyclonal, sc-32577), PERK (rabbit polyclonal, sc-13073), phospho-eIF2 α (peIF2 α) (rabbit polyclonal, sc-12412), eIF2 α (rabbit polyclonal, sc-11386), I κ B (rabbit polyclonal, sc-1643), NF κ B/p50 (rabbit polyclonal, sc-7178), Myd88 (rabbit polyclonal, sc-11356), phospho-JNK (pJNK) (rabbit polyclonal, sc-12882), phospho-IKK (pIKK) (rabbit polyclonal, sc-23470), POMC (rabbit polyclonal, sc-20148), AgRP (rabbit polyclonal, sc-18634), TLR4 (rabbit polyclonal, sc-13591), F4/80 (rabbit polyclonal, sc-25830), and FITC or rodhamin conjugated goat and rabbit antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). A annexin V FITC foi produzida pelo laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de São Paulo. O anticorpo anti-sinaptofisina (rabbit polyclonal, A0010) foi fornecido pela DAKO (Glostrup, Denmark). Anticorpo anti-caspase-3 fornecido pela Cell Signaling (Danvers, MA, USA). O kit para a detecção de apoptose por TUNEL foi da Upstate Cell Signaling Solutions (Temecula, CA, USA). Reagentes para o real-time PCR foram da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Animais

Para o estudo foram utilizados ratos machos da cepa Wistar e camundongos machos C3H/HeJ (com perda de função do receptor TLR4) e seus respectivos controles (C3H/HeJ Pas), todos provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais de 4 semanas foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por unidade, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo que em um os animais receberam água *ad libitum* e ração comercial para roedores, sendo 10 animais alimentados com esta dieta por 8 semanas (antes da extração hipotalâmica) e mais 10 animais alimentados por 16 semanas nestas mesmas condições. No outro grupo, animais receberam dieta hiperlipídica (baseada na AIN 93G modificada para 35% de lipídeos) e água *ad libitum*, também em grupos de 8 e 16 semanas (10 animais cada) com esta dieta.

Para o experimento de pareamento por consumo calórico, ratos Wistar foram acomodados em gaiolas individuais (16 animais, sendo 8 com dieta hiperlipídica e 8 com ração *ad libitum*). Cada rato recebeu por dia (por 2 meses) o equivalente a 18,26 g de dieta, afim de que ingerisse a mesma quantidade de calorias consumido por um rato tratado ração padrão *ad libitum*. Esse valor foi tirado da seguinte maneira:

- Ratos Wistar em 24 h ingerem por volta de 25g de ração convencional;
- 25g de ração possui 105kcal (cada g de ração tem 4,2 kcal);
- 25g de dieta hiperlipídica possui 143,75 kcal (cada g de dieta tem 5,75 kcal);

- Portanto:

25g de dieta--- 143,75 kcal

X g de dieta--- 105 kcal

X=18,26g/dia

Camundongos C3H/HeJ e controles foram acomodados também em gaiolas individuais. Cinco animais mutantes recebiam dieta HL *ad libitum* e 5 recebiam ração *ad libitum*. Os controles foram divididos da mesma forma. Foram seguidas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

Procedimento Cirúrgico

Ao ratos (250-300g) foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg, ip) e posicionados sob o aparelho esterotáxico fixando sua cabeça e boca. A cânula foi fixada em um lugar apropriado no aparelho. A coordenada foi 0° no local onde sua boca foi fixada. Após fixada a cabeça foi feita a incisão; o periósteo foi aberto expondo a sutura sagital. As coordenadas lateral, anteroposterior e dorsoventral do ventrículo lateral do hipotálamo foram obtidas do atlas Paxinos and Watson (Paxinos, Watson et al. 1980). O bregma foi usado como ponto de referência e um orifício foi perfurado no osso parietal na junção das coordenadas lateral e anteroposterior. Dois pequenos orifícios foram perfurados ao redor do orifício central, e os parafusos de aço inoxidável foram inseridos pela metade. A cânula foi posicionada no orifício central e abaixada cuidadosamente até que a coordenada dorsoventral fosse alcançada. A cânula foi fixada no crânio usando acrílico polimerizante (resina). Após a secagem da resina o animal foi retirado do aparelho e ficou 7 dias se recuperando do procedimento cirúrgico (Carvalho, Siloto et al. 2001). Após estes sete dias, foi realizado teste com angiotensina II (2µl / 10⁻⁴M) diluída em solução salina, injetada na cânula, para verificar se esta foi corretamente inserida no hipotálamo. O efeito central da angiotensina é a indução de uma potente resposta dipsogênica.

Infusões intracerebroventricular

Após dois dias do teste de AII, foi injetado na cânula GNSo nas concentrações de 1mM, 10 mM e 100mM/2µl, duas vezes ao dia, em um período de sete dias. Após estes dias, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (15 mg/100 g de peso, i.p.), assegurando a perda dos reflexos. Então, o hipotálamo

retirado, o qual foi submetido à imunoprecipitação e *immunoblotting* para verificar o efeito do doador de óxido nítrico nas proteínas da via apoptótica.

Array em real time-PCR

A avaliação do efeito da dieta na expressão de especificidades de RNA codificadores de proteínas envolvidas com apoptose foi realizada utilizando-se o kit *RT² profiler PCR array rat apoptosis* (SuperArray Bioscience Corporation) de acordo com as orientações do fabricante. Esse kit permite a avaliação simultânea da expressão de 84 especificidades de RNAm envolvidos com apoptose.

*Tabela 1. Composição de macronutrientes das dietas.

Ingredientes	American Institute of Nutrition (1kg)	Hiperlipídica 1kg
Amido	465,7g	115,5g
Caseína	140g	200g
Amido de milho dextrinizado	155g	132g
Sacarose	100g	100g
Óleo de soja	40g	70g
Gordura Animal	0g	282g
Celulose microfina (Fibra)	50g	50g
Mix Minerais	35g	35g
Mix Vitaminas	10g	10g
L-cistina	1,8g	3,0g
Bitartato de colina	2,5g	2,5g
Somatório total	1000g	1000g

Extração Hipotalâmica

Após anestesia com tiopental sódico se procedeu à abertura da pele, tecido celular subcutâneo e musculatura paravertebral da região cervical posterior; ao ser alcançado o forame magno foi realizado craniotomia com

conseqüente exposição do cérebro, que após retirado do crânio e cortado em plano frontal, possibilitou a identificação e extração do hipotálamo.

Análise de proteínas por immunoblotting

O hipotálamo extraído foi submetido à homogeneização em tampão de extração [1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2 mmol/l PMSF; 0.2 mg/ml aprotinina, à 4°C]. Os fragmentos celulares foram centrifugados (11.000 rpm, 20 minutos, 4° C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford, utilizando-se para isso, o reagente Biureto. O sobrenadante foi utilizado para imunoprecipitação *overnight*, à 4°C, com anticorpos específicos. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A Sepharose 6 MB à 4°C. Após lavagem e centrifugação, as proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli (Laemmli 1970) e aquecidas rapidamente em água fervente. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado em solução Basal: 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0.02% Tween 20) à temperatura ambiente. A membrana foi então incubada *overnight* com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (3% leite em pó desnatado). A seguir, as membranas foram lavadas 3x de 5 minutos com solução basal. Após, as membranas foram incubadas por 3 minutos com solução específica para quimioluminescência (Sigma), afim de marcar as bandas específicas. A visualização foi realizada por exposição das membranas à filmes de raio-X. As bandas identificadas na autoradiografia foram quantificadas nas suas áreas utilizando-se densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa Scion Image (Scioncorp).

Imunohistoquímica

Hipotálamos fixados com paraformaldeído foram seccionados (5µm) e submetidos a marcação simples ou dupla usando anticorpos, BAX, Bcl-2, sinaptofisina, neuromedina-N, POMC, AGrP, caspase 3, TLR 4 e F4/80 de acordo com protocolo previamente descrito (Torsoni, Carvalheira et al. 2003; Araujo, Amaral et al. 2004). Análise e documentação dos resultados foram realizadas utilizando o microscópio de imunofluorescência Leica FW 4500 B. A avaliação semiquantitativa foi alcançada por contagem do número de células positivamente coradas, as quais foram contadas no núcleo arqueado e hipotálamo lateral, locais de coloração predominante dos anticorpos utilizados. Campos de dimensões iguais foram utilizados para delimitar a contagem, sempre em aumento de 200x.

Marcação com Anexina V - FITC

Cortes histológicos do hipotálamo dos animais tratados com dieta, após serem desparafinizados foram lavados três vezes com PBS 0,1M pH7,4. Depois, foram lavados novamente, por 5 minutos, com tampão de ligação recomendado pelo fabricante (10mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1,8mM CaCl₂, mantido a 4° C). A seguir, as lâminas foram incubadas com o anticorpo Anexina V na diluição 1:500 em tampão de ligação. Depois dos 20 minutos, as lâminas foram lavadas mais 2 vezes com tampão de ligação. Foram então montadas com corante Vectashield com DAPI. As lamínulas foram coladas e as lâminas lidas em seguida em microscópio de imunofluorescência Leica FW 4500 B.

Microscopia eletrônica de transmissão

Nesta técnica utilizou-se fixador contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PB (phosphate buffer) 0,1M, pH 7,4. Após a permanência dos hipotálamos em fixador por 12 horas em temperatura de 4°C, estes foram lavados três vezes em PB 0,01M, pH 7,4 e seccionados longitudinalmente. Os fragmentos colocados individualmente em frascos contendo PB foram pós-fixados, por um período de duas horas, em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em PB, 0,1M, pH 7,4. Seguindo-se a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de álcool e acetona, sendo incluídos em

resina (Epon, EMS). Os blocos foram desbastados e secções semifinas (0,5µm) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio óptico. A seguir, após a identificação das áreas hipotalâmicas de acordo com as coordenadas de Atlas estereotáxico (Paxinos, 1997), os blocos foram retrimados para o isolamento da região contendo os núcleos hipotalâmicos a serem analisados. Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos com espessura de 50 nm (500Å; ultramicrotomo Leica Ultracut UCT). Estes cortes foram coletados em telas de cobre (“single slot grids”) recobertas com formvar, e contrastados com acetato de uranila 6% e citrato de chumbo. Os espécimes foram observados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão

(Leo 906), operando a 60KV. Os neurônios apoptóticos foram contatos em campos de menor magnitude na análise do microscópio eletrônico e foram representados em % (aumento 200x).

TUNEL (Terminal Deoxinucleotide Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)

Secções hipotalâmicas de ratos tratados com dieta ou não por 2 e 4 meses foram incluídos em parafina de acordo com o método previamente descrito (Torsoni, Carvalheira et al. 2003; Araujo, Amaral et al. 2004). Após os processos de desparafinização e hidratação, os cortes foram lavados, colocados em câmara fechada e incubados com PBS 0,1M em pH 7,4 por 30 min em banho-maria a 37° C. Após, o PBS foi removido e as lâminas foram inubadas com proteinase K (uma parte de proteinase K para 24 partes de PBS) por 15-30 min a 37° C. Após, a reação da proteinase K é interrompida com a lavagem das secções com PBS por 4x de 2min. As lâminas então são incubadas com 50ul por secção com TdT buffer por 5-10 min. Depois, são incubadas com 50ul do cocktail “TdT end-labeling” (TdT buffer, Biotina-dUTP e TdT na proporção de 90:5:5, respectivamente) por 60 min a 37° C. A seguir, as lâminas foram imergidas em TB buffer (Tris borate buffer) (1 parte de TB buffer 10x com 9 partes de água destilada) por 5 min, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS 4x de 2 min. Após, foi aplicado 50 ul de Blocking Solution (uma parte de blocking solution com 3 partes de PBS) por 20 min em temperatura ambiente. Então, as lâminas foram incubadas com 50 ul de avidina –FITC (1 parte de avidina com 9 partes de blocking buffer previamente preparado) por 30 min no escuro a 37° C. As secções foram então lavadas por 2x de 15 min. no escuro e em temperatura ambiente. As lâminas então foram contracoradas com iodeto de propídeo em baixa concentração e

posteriormente montadas com as lamínulas e esmalte e analisadas em microscópio de fluorescência Leica FW 4500 B. As células positivas foram expressas em % das células totais por campo.

Análise Estatística

Os blots foram analisados por densitometria óptica. Os valores numéricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos de teste *post hoc* (Tukey) ou teste-T quando adequado. Em todos os experimentos o nível de significância foi $p < 0,05$ e $n \geq 5$.

7. CONCLUSÕES

Nosso trabalho mostrou que:

- O consumo de uma dieta rica em lípidos induz apoptose em neurônios com papel relevante no controle da ingestão alimentar no hipotálamo;
- Esse fenômeno é dependente do *background* genético, assim como de diferentes fatores ambientais;
- A capacidade da dieta hiperlipídica em ativar proteínas apoptóticas é dependente de sua composição apenas, e não da quantidade consumida de calorias;
- Durante a inflamação hipotalâmica induzida por dieta, o TLR 4, presente nas células da micróglia, exerce duas funções: ativa vias pró-inflamatórias que ocasionam resistência à leptina e insulina, mas que também reprime maiores danos por equilibrar a atividade apoptótica.

8. BIBLIOGRAFIA

- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**(2): 423-32.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-7.
- Akira, S. (2003). "Toll-like receptor signaling." J Biol Chem **278**(40): 38105-8.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Amaravadi, R. and C. B. Thompson (2005). "The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets." J Clin Invest **115**(10): 2618-24.
- Araujo, E. P., M. E. Amaral, et al. (2004). "Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2." J Endocrinol **181**(1): 25-38.
- Araujo, E. P., C. T. De Souza, et al. (2005). "Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity." Endocrinology **146**(3): 1428-37.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Astrup, A., J. Dyerberg, et al. (2008). "Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases." Obes Rev **9 Suppl 1**: 48-52.
- Bannerman, D. D., J. C. Tupper, et al. (2002). "Divergence of bacterial lipopolysaccharide pro-apoptotic signaling downstream of IRAK-1." J Biol Chem **277**(10): 8048-53.
- Bao, Q., S. J. Riedl, et al. (2005). "Structure of Apaf-1 in the auto-inhibited form: a critical role for ADP." Cell Cycle **4**(8): 1001-3.
- Barreiro, G. C., R. R. Prattali, et al. (2004). "Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats." Biochem Biophys Res Commun **320**(3): 992-7.
- Baumgartener, J. W. (2003). "SHIP2: an emerging target for the treatment of type 2 diabetes mellitus." Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **3**(4): 291-8.
- Beere, H. M. (2005). "Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways." J Clin Invest **115**(10): 2633-9.

- Beg, A. A. (2002). "Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses." Trends Immunol **23**(11): 509-12.
- Bence, K. K., M. Delibegovic, et al. (2006). "Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action." Nat Med **12**(8): 917-24.
- Bertelli, D. F., E. P. Araujo, et al. (2006). "Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight." Endocrinology **147**(11): 5385-99.
- Blaise, G. A., D. Gauvin, et al. (2005). "Nitric oxide, cell signaling and cell death." Toxicology **208**(2): 177-92.
- Block, M. L., L. Zecca, et al. (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." Nat Rev Neurosci **8**(1): 57-69.
- Boyce, M., K. F. Bryant, et al. (2005). "A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress." Science **307**(5711): 935-9.
- Bredesen, D. E., R. V. Rao, et al. (2006). "Cell death in the nervous system." Nature **443**(7113): 796-802.
- Carvalho, J. B., E. B. Ribeiro, et al. (2003). "Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver." Biol Chem **384**(1): 151-9.
- Carvalho, J. B., R. M. Siloto, et al. (2001). "Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus." FEBS Lett **500**(3): 119-24.
- Chiarugi, A. and M. A. Moskowitz (2002). "Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death?" Science **297**(5579): 200-1.
- Cnop, M., N. Welsh, et al. (2005). "Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities." Diabetes **54 Suppl 2**: S97-107.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-19.
- Dash, P. R., J. E. Cartwright, et al. (2003). "Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation." Exp Cell Res **287**(2): 314-24.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2005). "Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus." Endocrinology **146**(10): 4192-9.

- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2005). "Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice." Diabetologia **48**(9): 1860-71.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2007). "Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action." Faseb J **21**(4): 1153-63.
- Degasperi, G. R., T. Romanatto, et al. (2008). "UCP2 protects hypothalamic cells from TNF-alpha-induced damage." FEBS Lett **582**(20): 3103-10.
- Dempsey, P. W., S. E. Doyle, et al. (2003). "The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 193-209.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, et al. (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." J Clin Invest **105**(12): 1827-32.
- Eldering, E., C. A. Spek, et al. (2003). "Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways." Nucleic Acids Res **31**(23): e153.
- Flier, J. S. (2004). "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." Cell **116**(2): 337-50.
- Freire, R. D., M. A. Cardoso, et al. (2003). "Nutritional status of Japanese-Brazilian subjects: comparison across gender and generation." Br J Nutr **89**(5): 705-13.
- Friedman, J. M. (2000). "Obesity in the new millennium." Nature **404**(6778): 632-4.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." Nature **395**(6704): 763-70.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**(Pt 2): 201-32.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- Gottschalk, A. R., L. H. Boise, et al. (1996). "The ability of Bcl-x(L) and Bcl-2 to prevent apoptosis can be differentially regulated." Cell Death Differ **3**(1): 113-8.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2005). "Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?" J Clin Invest **115**(10): 2610-7.

- Gupta, S. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules." Exp Gerontol **37**(2-3): 293-9.
- Ha, K. S., K. M. Kim, et al. (2003). "Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation." FASEB J **17**(9): 1036-47.
- Hampton, R. Y. (2000). "ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins." Curr Biol **10**(14): R518-21.
- Hanisch, U. K., T. V. Johnson, et al. (2008). "Toll-like receptors: roles in neuroprotection?" Trends Neurosci **31**(4): 176-82.
- Harada, H. and S. Grant (2003). "Apoptosis regulators." Rev Clin Exp Hematol **7**(2): 117-38.
- Harding, H. P., M. Calton, et al. (2002). "Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 575-99.
- Harley, E. A. and N. Levens (2003). "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and obesity: recent advances." Curr Opin Investig Drugs **4**(10): 1179-89.
- Hersey, P. and X. D. Zhang (2003). "Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis." J Cell Physiol **196**(1): 9-18.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature **420**(6913): 333-6.
- Hotamisligil, G. S. (2000). "Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 4**: S23-7.
- Hotamisligil, G. S. (2003). "Inflammatory pathways and insulin action." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S53-5.
- Howard, J. K., B. J. Cave, et al. (2004). "Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3." Nat Med **10**(7): 734-8.
- Hsu, L. C., J. M. Park, et al. (2004). "The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4." Nature **428**(6980): 341-5.
- Hull, C., G. McLean, et al. (2002). "Lipopolysaccharide signals an endothelial apoptosis pathway through TNF receptor-associated factor 6-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase." J Immunol **169**(5): 2611-8.
- Kaufman, R. J., D. Scheuner, et al. (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 411-21.

- Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." Semin Immunol **19**(1): 24-32.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2548-56.
- Kharroubi, I., L. Ladriere, et al. (2004). "Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress." Endocrinology **145**(11): 5087-96.
- Kim, Y. M., H. Bergonia, et al. (1995). "Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes." FEBS Lett **374**(2): 228-32.
- Kim, Y. M., H. T. Chung, et al. (1999). "Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling." J Neurosci **19**(16): 6740-7.
- Kohn, L. D., B. Wallace, et al. (2005). "Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system?" Endocrinology **146**(10): 4189-91.
- Kokoeva, M. V., H. Yin, et al. (2005). "Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance." Science **310**(5748): 679-83.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." Blood **84**(5): 1415-20.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." Nature **404**(6778): 635-43.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-42.
- Kwon, Y. G., J. K. Min, et al. (2001). "Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production." J Biol Chem **276**(14): 10627-33.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lavrik, I. N., A. Golks, et al. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-72.
- Lawen, A. (2003). "Apoptosis-an introduction." Bioessays **25**(9): 888-96.
- Leber, B., J. Lin, et al. (2007). "Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes." Apoptosis **12**(5): 897-911.
- Lee, J. Y. and D. H. Hwang (2006). "The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors." Mol Cells **21**(2): 174-85.

- Lee, J. Y., K. H. Sohn, et al. (2001). "Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(20): 16683-9.
- Lee, J. Y., J. Ye, et al. (2003). "Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids." J Biol Chem **278**(39): 37041-51.
- Letai, A. (2005). "Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death." J Clin Invest **115**(10): 2648-55.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-9.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**(1): 147-57.
- Lu, Y., S. Fukuyama, et al. (2006). "Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic." J Biol Chem **281**(48): 36683-90.
- Luo, J. L., H. Kamata, et al. (2005). "IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy." J Clin Invest **115**(10): 2625-32.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2001). "The unfolding tale of the unfolded protein response." Cell **107**(7): 827-30.
- MacEwan, D. J. (2002). "TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences." Cell Signal **14**(6): 477-92.
- Mauvais-Jarvis, F. and C. R. Kahn (2000). "Understanding the pathogenesis and treatment of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: what can we learn from transgenic and knockout mice?" Diabetes Metab **26**(6): 433-48.
- McCowen, K. C., A. Malhotra, et al. (2001). "Stress-induced hyperglycemia." Crit Care Clin **17**(1): 107-24.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "The Toll receptor family and microbial recognition." Trends Microbiol **8**(10): 452-6.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Milanski, M., G. Degasperi, et al. (2009). "Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity." J Neurosci **29**(2): 359-70.
- Mori, K. (2000). "Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum." Cell **101**(5): 451-4.

- Munshi, N., A. Z. Fernandis, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor." J Immunol **168**(11): 5860-6.
- Munzberg, H., J. S. Flier, et al. (2004). "Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice." Endocrinology **145**(11): 4880-9.
- Muppidi, J. R., J. Tschopp, et al. (2004). "Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction." Immunity **21**(4): 461-5.
- Murphy, K. M., V. Ranganathan, et al. (2000). "Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells." Cell Death Differ **7**(1): 102-11.
- Muzio, M., G. Natoli, et al. (1998). "The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)." J Exp Med **187**(12): 2097-101.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." Science **306**(5695): 457-61.
- Pasinetti, G. M. and J. A. Eberstein (2008). "Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease." J Neurochem **106**(4): 1503-14.
- Paxinos, G., C. R. Watson, et al. (1980). "AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates." J Neurosci Methods **3**(2): 129-49.
- Picardi, P. K., V. C. Calegari, et al. (2008). "Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats." Endocrinology **149**(8): 3870-80.
- Prentice, A. M. and S. A. Jebb (2003). "Fast foods, energy density and obesity: a possible mechanistic link." Obes Rev **4**(4): 187-94.
- Reimertz, C., D. Kogel, et al. (2003). "Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway." J Cell Biol **162**(4): 587-97.
- Rintamaki, R., S. Grimaldi, et al. (2008). "Seasonal changes in mood and behavior are linked to metabolic syndrome." PLoS ONE **3**(1): e1482.
- Ryu, K. Y., J. C. Garza, et al. (2008). "Hypothalamic neurodegeneration and adult-onset obesity in mice lacking the Ubb polyubiquitin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 4016-21.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.

- Schwartz, M. W. and S. E. Kahn (1999). "Insulin resistance and obesity." Nature **402**(6764): 860-1.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-71.
- Shi, H., M. V. Kokoeva, et al. (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." J Clin Invest **116**(11): 3015-25.
- Shimazu, R., S. Akashi, et al. (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." J Exp Med **189**(11): 1777-82.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2003). "Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S49-52.
- Siegel, R. M., J. Muppidi, et al. (2003). "Death receptor signaling and autoimmunity." Immunol Res **27**(2-3): 499-512.
- Spiegelman, B. M. and J. S. Flier (2001). "Obesity and the regulation of energy balance." Cell **104**(4): 531-43.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**(7): 933-40.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-83.
- Torsoni, M. A., J. B. Carvalheira, et al. (2003). "Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(1): E216-23.
- Trump, B. F., I. K. Berezesky, et al. (1997). "The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis." Toxicol Pathol **25**(1): 82-8.
- Tsukumo, D. M., M. A. Carvalho-Filho, et al. (2007). "Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance." Diabetes **56**(8): 1986-98.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." Nature **389**(6651): 610-4.
- van Genderen, H. O., H. Kenis, et al. (2008). "Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization." Biochim Biophys Acta **1783**(6): 953-63.

Vogl, T., K. Tenbrock, et al. (2007). "Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock." Nat Med **13**(9): 1042-9.

Wade, G. N. (1982). "Obesity without overeating in golden hamsters." Physiol Behav **29**(4): 701-7.

Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." Science **296**(5573): 1635-6.

West, D. B., J. Goudey-Lefevre, et al. (1994). "Dietary obesity linked to genetic loci on chromosomes 9 and 15 in a polygenic mouse model." J Clin Invest **94**(4): 1410-6.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.

Xu, D., H. Liu, et al. (2004). "Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity." Cell Mol Immunol **1**(4): 239-46.

Xue, B., Y. B. Kim, et al. (2007). "Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance." J Biol Chem **282**(33): 23829-40.

Yuan, M., N. Konstantopoulos, et al. (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta." Science **293**(5535): 1673-7.

Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.